



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

UTILIZAÇÃO DO PCR *REAL-TIME* NA DETECÇÃO DE HERPESVÍRUS FELINO-1 E
CHLAMYDOPHILA FELIS EM GATOS COM MANIFESTAÇÕES OCULARES

Alexandra Sofia Schonburg Carrillo de Mira

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Luís Manuel Morgado Tavares

Doutor Virgílio da Silva Almeida

Doutora Ana Isabel Simões Pereira Duarte

Doutora Esmeralda Sofia da Costa Delgado

ORIENTADOR

Doutora Esmeralda Sofia da Costa Delgado

CO-ORIENTADOR

Doutora Ana Isabel Simões Pereira Duarte

2010

LISBOA



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

UTILIZAÇÃO DO PCR *REAL-TIME* NA DETECÇÃO DE HERPESVÍRUS FELINO-1 E
CHLAMYDOPHILA FELIS EM GATOS COM MANIFESTAÇÕES OCULARES

Alexandra Sofia Schonburg Carrillo de Mira

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Luís Manuel Morgado Tavares

Doutor Virgílio da Silva Almeida

Doutora Ana Isabel Simões Pereira Duarte

Doutora Esmeralda Sofia da Costa Delgado

ORIENTADOR

Doutora Esmeralda Sofia da Costa Delgado

CO-ORIENTADOR

Doutora Ana Isabel Simões Pereira Duarte

2010

LISBOA

Agradecimentos

À Professora Doutora Esmeralda Delgado, pela simpatia e generosidade e pelos conhecimentos transmitidos. Pela serenidade com que me guiou na elaboração desta Dissertação.

À Professora Doutora Ana Duarte, um grande agradecimento pela amabilidade com que sempre me recebeu, pelo empenho com que me ajudou neste trabalho e pela paciência que demonstrou ao longo da sua co-orientação.

Aos Médicos Veterinários e aos auxiliares do Hospital Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária, por tudo o que me ensinaram. Aos colegas de estágio, pelo companheirismo. Aos animais que fizeram parte do meu estudo e aos respectivos donos, pela sua paciência e colaboração.

À minha mãe, por me apoiar incondicionalmente e por constituir um porto seguro indispensável na minha vida. Ao meu pai, que me deu, ao longo da escrita desta Dissertação, tanta ajuda e incentivo. A ambos, porque não há como agradecer tudo o que me deram e como sempre se esforçaram para que eu me sentisse feliz e realizada ao longo da minha vida.

Aos meus irmãos Filipe e Rodrigo, que me ajudaram a corrigir alguns aspectos deste trabalho, porque não imagino a minha vida sem eles.

À Guma e à tia Alicia, e à minha restante família na Colômbia, por me acolherem com tanto entusiasmo e me mimarem tanto durante a minha estadia.

A todos os Médicos Veterinários, funcionários e estagiários da Clínica Veterinária Dover, mas em especial ao Dr Oscar Benavides, por me receberem.

Ao Pinhão, por ao longo destes 10 anos me ter mostrado o que significa ser “o melhor amigo do Homem”. Ao Anúbis e à Ísis, que fizeram parte deste estudo, por aumentarem ainda mais a admiração que tenho pela sua espécie.

À Joana Cuba, por todos os momentos passados, porque a vida académica é mais fácil com um amigo ao nosso lado. À Mónica Costa, por sempre me ter demonstrado uma grande amizade ao longo destes mais de 6 anos.

À Caty, por tudo o que já passámos juntas em tão pouco tempo e por ter a paciência de me ouvir. À Ana Maria, por ser uma amiga constante e generosa.

À Joaquina, pela inestimável ajuda que me deu com a parte estatística deste trabalho, e por me ter bondosamente transmitido calma e serenidade durante esta recta final. À Márcia, que mesmo desde a ilha do Pico me deu apoio com o SPSS. À Catarina, que me ajudou com a parte da formatação. Às três, e ainda à Ana Sofia Ribeiro, pela amizade que foi crescendo nestes últimos anos.

À Margarida e ao Diogo, por insistirem em me recordar que há vida para além da faculdade.
À Andreia e ao Luís, por serem meus amigos há tantos anos. À Mónica Justino e à Marta, que sempre me divertem com as suas histórias da “outra” Medicina.
À tia Mónica e ao tio Pedro, por me possibilitarem um primeiro vislumbre do mundo da Medicina Veterinária.

Utilização do PCR *real-time* na detecção de herpesvírus felino-1 e *Chlamydophila felis* em gatos com manifestações oculares

Resumo

A coriza felina, um problema de apresentação frequente na prática clínica, afecta principalmente os animais mais jovens, mostrando-se por regra auto-limitante. Em alguns indivíduos, porém, os sinais clínicos tornam-se crónicos ou recorrentes.

No presente trabalho avaliou-se por PCR *real-time* a presença de herpesvírus felino-1 (HVF-1) e de *Chlamydophila felis*, os agentes mais importantes no desenvolvimento das manifestações oculares de coriza, em 24 gatos com e sem sinais oculares compatíveis com esta síndrome. O HVF-1 apresentou uma prevalência global de 87,5%, enquanto a *C. felis* apenas se detectou em 4,17% dos casos. Não foi possível encontrar uma associação estatisticamente significativa entre a quantidade de vírus existente nas amostras e a presença de sinais oculares, ou entre a quantidade de vírus e a gravidade desses sinais. Observou-se, no entanto, uma correlação negativa entre a classe etária dos 2 aos 6 meses e a carga viral no olho esquerdo, entre a idade e a presença de simbléfaro, entre a presença de conjuntivite e a carga viral orofaríngea e entre a presença de corrimento ocular purulento ou mucopurulento e a carga viral orofaríngea. O PCR *real-time* permitiu detectar o HVF-1 num maior número de amostras do que o PCR convencional, mostrando assim, aparentemente, uma maior sensibilidade, o que poderá justificar a sua preferência em relação à modalidade clássica. Contudo, devemos encarar estes resultados com precaução, uma vez que a amostra utilizada apresentava uma dimensão reduzida.

Palavras-chave: coriza felina, herpesvírus felino-1, *Chlamydophila felis*, PCR *real-time*

Detection of feline herpesvirus-1 and *Chlamydophila felis* by real-time PCR in cats with ocular signs

Abstract

Feline infectious respiratory disease is commonly seen in clinical practice, especially among young animals, and it is usually self-limiting. Some cats, however, develop chronic or recurring signs.

In the present study we tested 24 cats with and without ocular signs of feline infectious respiratory disease for the presence of feline herpesvirus-1 (FHV-1) and *Chlamydophila felis*, which are the most important causes of these manifestations, using real-time PCR. FHV-1 had a prevalence of 87,5%, whereas *C. felis* was only detected in 4,17% of the animals. There wasn't a significant correlation between the viral load found in our samples and the presence of ocular signs, nor between viral load and the severity of those signs. There was, however, a negative correlation between the 2 to 6 months age group and the viral load in conjunctival swabs of the left eye. We also found a negative correlation between age and the presence of symblepharon, between conjunctivitis and the viral load found in oropharyngeal swabs and between purulent or mucopurulent ocular discharge and the viral load in oropharyngeal swabs. FHV-1 was detected more often by real-time than by conventional PCR, which suggests a greater sensibility of the former technique, justifying its preference. These results must be interpreted with caution, due to the small size of the populational sample.

Key words: feline infectious respiratory disease, feline herpesvirus-1, *Chlamydophila felis*, real-time PCR

Índice

Índice de figuras.....	x
Índice de tabelas.....	x
Índice de gráficos.....	xi
Índice de abreviaturas.....	xii
Capítulo I – Revisão bibliográfica.....	1
1. Breve revisão da anatomia do olho.....	2
1.1 O globo ocular.....	2
1.1.1 A córnea.....	2
1.2 Os órgãos oculares acessórios.....	3
1.2.1 A conjuntiva.....	4
2. A coriza felina.....	4
2.1 Epidemiologia e sinais clínicos.....	4
2.2 Etiologia.....	5
2.3 Diagnóstico.....	5
2.4 Tratamento.....	6
2.5 Profilaxia.....	6
3. Coriza felina: manifestações oculares de cada agente etiológico.....	7
3.1 Herpesvírus felino-1 (HVF-1).....	7
3.1.1 Introdução.....	7
3.1.1.1 Caracterização do agente.....	7
3.1.1.2 Epidemiologia.....	8
3.1.1.3 Patogenia.....	8
3.1.1.4 Quadro clínico.....	9
3.1.1.5 Métodos complementares de diagnóstico.....	10
3.1.1.5.1 Métodos de detecção viral.....	10
3.1.1.5.2 Serologia.....	12
3.1.1.6 Tratamento.....	12
3.1.1.7 Profilaxia médica.....	12
3.1.2 Manifestações oculares.....	13
3.1.2.1 Conjuntivite.....	13
3.1.2.1.1 Tratamento.....	14
3.1.2.2 Queratite.....	15
3.1.2.2.1 Tratamento.....	18
3.1.2.3 Simbléfaro.....	23
3.1.2.4 Queratoconjuntivite seca.....	24
3.1.2.5 Outras.....	24
3.2 Calicivírus felino (CVF).....	26
3.2.1 Introdução.....	26
3.2.1.1 Caracterização do agente.....	26
3.2.1.2 Epidemiologia.....	26
3.2.1.3 Patogenia.....	27
3.2.1.4 Quadro clínico.....	28
3.2.1.5 Métodos complementares de diagnóstico.....	29
3.2.1.5.1 Métodos de detecção viral.....	29
3.2.1.5.2 Serologia.....	30
3.2.1.6 Tratamento.....	30
3.2.1.7 Profilaxia.....	31
3.2.1.7.1 Profilaxia médica.....	31

3.2.1.7.2 Profilaxia sanitária	31
3.2.2 Manifestações oculares.....	31
3.3 <i>Bordetella bronchiseptica</i>	32
3.3.1 Introdução.....	32
3.3.1.1 Caracterização do agente	32
3.3.1.2 Epidemiologia	32
3.3.1.3 Patogenia	33
3.3.1.4 Quadro clínico.....	34
3.3.1.5 Métodos complementares de diagnóstico	34
3.3.1.6 Tratamento.....	35
3.3.1.7 Profilaxia médica.....	35
3.3.2 Manifestações oculares.....	36
3.4 <i>Chlamydophila felis</i>	36
3.4.1 Introdução.....	36
3.4.1.1 Caracterização do agente	36
3.4.1.2 Epidemiologia	37
3.4.1.3 Patogenia	37
3.4.1.4 Quadro clínico.....	38
3.4.1.5 Métodos complementares de diagnóstico	39
3.4.1.5.1 Métodos de detecção bacteriana.....	39
3.4.1.5.2 Serologia	40
3.4.1.6 Tratamento.....	40
3.4.1.7 Profilaxia médica.....	40
3.4.2 Manifestações oculares.....	41
3.4.2.1 Conjuntivite	41
3.4.2.1.1 Tratamento.....	42
3.5 <i>Mycoplasma</i> spp.....	43
3.5.1 Introdução.....	43
3.5.1.1 Caracterização do agente	43
3.5.1.2 Epidemiologia	44
3.5.1.3 Patogenia	44
3.5.1.4 Quadro clínico.....	45
3.5.1.5 Métodos complementares de diagnóstico	45
3.5.1.6 Tratamento.....	46
3.5.1.7 Profilaxia.....	46
3.5.2 Manifestações oculares.....	46
3.5.2.1 Conjuntivite	46
3.5.2.1.1 Tratamento.....	46
4. O PCR como método complementar de diagnóstico.....	47
4.1 Breve descrição da técnica.....	47
4.2 Detecção dos produtos amplificados	49
4.3 PCR <i>real-time</i>	49
4.4 Aplicações do PCR na oftalmologia veterinária	50
Capítulo II – Utilização do PCR <i>real-time</i> na pesquisa de herpesvírus felino - 1	53
e <i>Chlamydophila felis</i>.....	53
1. Objectivos.....	54
2. Material e métodos	55
2.1 Amostra populacional.....	55
2.2 Sinais clínicos.....	56
2.3 Colheita das amostras	57
2.4 Processamento laboratorial	58

2.5 PCR	58
2.5.1 HVF-1	58
2.5.1.1 Carga viral	60
2.5.2 <i>C. felis</i>	62
2.5.2.1 Carga bacteriana	63
2.6 Análise estatística	66
3. Resultados	66
3.1 Características da amostra populacional estudada	66
3.1.1 Sexo	66
3.1.2 Idade	67
3.1.3 Raça	68
3.2 Sinais clínicos	69
3.2.1 Sinais oculares	69
3.2.2 Sinais do tracto respiratório superior	70
3.2.3 Gravidade da sintomatologia	71
3.2.3.1 Quadro geral	71
3.2.3.2 Olho direito	71
3.2.3.3 Olho esquerdo	72
3.3 Resultados do PCR para o HVF-1	72
3.3.1 PCR convencional	72
3.3.2 PCR <i>real-time</i> (fig. 22 e 23)	73
3.3.2.1 Esfregaços orofaríngeos	74
3.3.2.2 Esfregaços conjuntivais do olho direito	75
3.3.2.3 Esfregaços conjuntivais do olho esquerdo	77
3.3.2.4 Prevalência global	79
3.3.2.5 Comparação com o PCR convencional	79
3.3.2.5.1 Esfregaços orofaríngeos	79
3.3.2.5.2 Esfregaços conjuntivais do olho direito	79
3.3.2.5.3 Esfregaços conjuntivais do olho esquerdo	79
3.4 Resultados do PCR para a <i>C. felis</i>	79
3.5 Correlações	80
3.5.1 Classe etária dos 2 aos 6 meses e carga viral nos esfregaços conjuntivais do olho esquerdo	80
3.5.2 Idade e simbléfaro	80
3.5.3 Raça Persa e carga viral nos esfregaços conjuntivais do olho direito	80
3.5.4 Conjuntivite e carga viral nos esfregaços orofaríngeos	81
3.5.5 Corrimento ocular purulento ou mucopurulento e carga viral nos esfregaços orofaríngeos	81
4.1 Sexo, idade e raça no grupo com sinais oculares	81
4.2 Sinais clínicos	82
4.3 Detecção de HVF-1 e <i>C. felis</i> por PCR	82
4.3.1 Prevalências	82
4.3.1.1 HVF-1	82
4.3.1.2 <i>C. felis</i>	83
4.3.1.3 Interpretação	83
4.3.2 Comparação entre os dois tipos de PCR	83
4.4 Correlações	84
4.4.1 Classe etária dos 2 aos 6 meses e carga viral nos esfregaços conjuntivais do olho esquerdo	85
4.4.2 Idade e simbléfaro	85
4.4.3 Conjuntivite e carga viral nos esfregaços orofaríngeos	85

4.4.4 Corrimento ocular purulento ou mucopurulento e carga viral nos esfregaços orofaríngeos	86
--	----

Capítulo III – Referências bibliográficas	89
--	-----------

Capítulo IV - Anexos	101
ANEXO I – ESTÁGIO CURRICULAR	102
ANEXO II – QUADRO COM OS RESULTADOS TOTAIS DA AMOSTRA.....	106
ANEXO III – TABELAS DA CORRELAÇÃO DE SPEARMAN.....	108

Índice de figuras

Fig. 1 Anatomia do globo ocular	2
Fig. 2 Coloração pela fluoresceína de uma úlcera da córnea que afecta o olho direito.....	3
Fig. 3 Anatomia da conjuntiva.....	4
Fig. 4 Conjuntivite crónica	5
Fig. 5 Infecção aguda pelo HVF-1 em gatinho com 2 meses de idade	9
Fig. 6 Reactivação de infecção herpética latente num gato adulto	10
Fig. 7 Queratoconjuntivite herpética crónica	14
Fig. 8 Queratite herpética associada a reactivação viral	17
Fig. 9 Queratite herpética unilateral associada a reactivação viral.....	18
Fig. 10 Sequestro da córnea.....	25
Fig. 11 Termociclador convencional	47
Fig. 12 Amplificação de um segmento de DNA por PCR	48
Fig. 13 Gráfico de amplificação	49
Fig. 14 Realização de esfregaço conjuntival.	57
Fig. 15 Realização de esfregaço orofaríngeo	58
Fig. 16 Gel de agarose para detecção dos productos de amplificação do HVF-1	59
Fig. 17 Termociclador <i>real-time</i>	59
Fig. 18 Curva de amplificação dos controlos positivos do HVF-1.....	60
Fig. 19 Recta de calibração para o HVF-1	62
Fig. 20 Gel de agarose para detecção dos productos de amplificação de <i>C. felis</i>	62
Fig. 21 Controlos positivo e negativo e amostra positiva para <i>C. felis</i>	63
Fig. 22 Curva de amplificação de duas réplicas de uma amostra positiva ao HVF-1	73
Fig. 23 Curva de amplificação de duas réplicas de uma amostra negativa ao HVF-1	73

Índice de tabelas

Tabela 1 Pontuação atribuída a cada sinal clínico para efeitos de classificação da gravidade do quadro geral.....	56
Tabela 2 Pontuação atribuída a cada sinal clínico para efeitos de classificação da gravidade da sintomatologia de cada olho	57
Tabela 3 C_t para cada um dos controlos positivos do HVF-1	60
Tabela 4 Concentração do controlo positivo em cada uma das diluições	61
Tabela 5 C_t e T_m dos controlos positivo e negativo e da amostra positiva mostrados na fig.21	63
Tabela 6 Cálculo do número de bases presentes na vacina para cada um dos agentes	64
Tabela 7 Concentração do controlo positivo em cada uma das diluições	65

Tabela 8 Média e desvio-padrão da carga viral encontrada nos esfregaços orofaríngeos (moléculas/ng)	75
Tabela 9 Média e desvio-padrão da carga viral encontrada nos esfregaços conjuntivais do olho direito (moléculas/ng)	77
Tabela 10 Média e desvio-padrão da carga viral encontrada nos esfregaços conjuntivais do olho esquerdo (moléculas/ng)	78

Índice de gráficos

Gráfico 1 Composição da amostra populacional	55
Gráfico 2 Distribuição por sexo da amostra em estudo	66
Gráfico 3 Distribuição por sexo nos animais com sintomatologia ocular	67
Gráfico 4 Distribuição por sexo nos indivíduos sem sinais oculares.....	67
Gráfico 5 Distribuição por idade na amostra em estudo.....	68
Gráfico 6 Distribuição por idade nos animais com sintomatologia ocular	68
Gráfico 7 Distribuição por idade nos indivíduos sem sinais oculares	68
Gráfico 8 Distribuição por raça na amostra em estudo.....	69
Gráfico 9 Distribuição por raça nos animais com sintomatologia ocular	69
Gráfico 10 Distribuição por raça nos indivíduos sem sinais oculares	69
Gráfico 11 Frequência dos diferentes sinais oculares	70
Gráfico 12 Classificação do corrimento ocular	70
Gráfico 13 Presença de sintomatologia relacionada com o tracto respiratório superior no grupo com sinais oculares.....	71
Gráfico 14 Gravidade do quadro geral nos indivíduos com sinais oculares.....	71
Gráfico 15 Gravidade da sintomatologia no olho direito	72
Gráfico 16 Gravidade da sintomatologia no olho esquerdo	72
Gráfico 17 Carga viral detectada nos esfregaços orofaríngeos (amostra global)	74
Gráfico 18 Carga viral detectada nos esfregaços orofaríngeos (indivíduos com sinais oculares)	74
Gráfico 19 Carga viral detectada nos esfregaços orofaríngeos (animais sem sintomatologia ocular).....	75
Gráfico 20 Carga viral detectada nos esfregaços conjuntivais do olho direito (amostra global)	76
Gráfico 21 Carga viral detectada nos esfregaços conjuntivais do olho direito (indivíduos com sinais oculares)	76
Gráfico 22 Carga viral detectada nos esfregaços conjuntivais do olho direito (animais sem sintomatologia ocular)	76
Gráfico 23 Carga viral detectada nos esfregaços conjuntivais do olho esquerdo (amostra global)	77
Gráfico 24 Carga viral detectada nos esfregaços conjuntivais do olho esquerdo (indivíduos com sinais oculares)	78
Gráfico 25 Carga viral detectada nos esfregaços conjuntivais do olho esquerdo (animais sem sintomatologia ocular)	78

Índice de abreviaturas

% - Percentagem
°C - Graus Celsius
µl - Microlitro
ATP - Adenosina trifosfato
b - Bases
bp - *Base pairs* (pares de bases)
cDNA - *Complementary DNA* (DNA complementar)
CRFK - *Crandell Rees feline kidney* (células renais felinas de Crandell Rees)
C_t – *Cycle threshold* (número do ciclo durante o qual a emissão de fluorescência ultrapassa o limiar)
CVF - Calicivírus felino
DNA - *Deoxyribonucleic acid* (ácido desoxirribonucleico)
EC - Europeu Comum
EDTA - *Ethylenediaminetetraacetic acid* (ácido etilenodiaminotetracético)
ELISA - *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ensaio imunoenzimático)
EUA – Estados Unidos da América
FeLV - *Feline leukemia virus* (vírus da leucemia felina)
FIV - *Feline immunodeficiency virus* (vírus da imunodeficiência felina)
FMV - Faculdade de Medicina Veterinária
FPLV - *Feline panleucopenia virus*, vírus da panleucopénia felina
x g – Força centrífuga
g - Grama
GTP - Guanosina trifosfato
HEFMV - Hospital escolar da Faculdade de Medicina Veterinária
HVF-1 - Herpesvírus felino-1
IBM – International business machines
IFN - Interferão
kg - Quilograma
LATs - *Latency associated transcripts* (RNAs virais associados à fase de latência)
M. felis - *Mycoplasma felis*
mg - Miligrama
ml - Mililitro
mM – Milimolar
MU – Milhões de unidades
ng – Nanograma
nM - Nanomolar
PBS – *Phosphate buffered saline* (tampão fosfato salino)
PCR - *Polymerase chain reaction* (reação em cadeia da polimerase)
PM – Peso molecular
pmol - Picomole
RNA - *Ribonucleic acid* (ácido ribonucleico)
RT-PCR - *Reverse transcription-PCR* (PCR com transcrição reversa)
SYBR – Synergy Brands
TAC - Tomografia axial computadorizada
T_m - *Melting temperature* (temperatura de dissociação)
TSA - Teste de sensibilidade aos antibióticos
U - Unidades
UI - Unidades internacionais

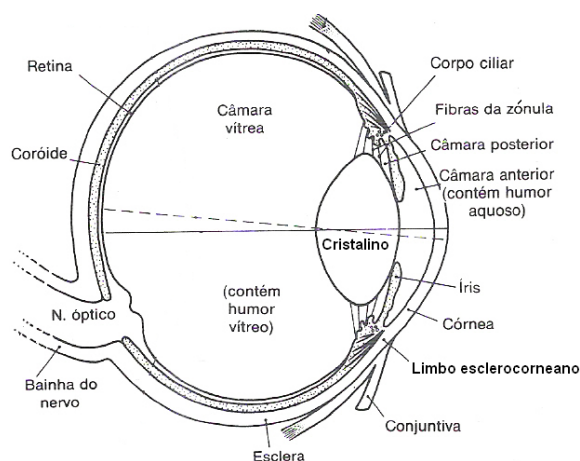
Capítulo I – Revisão bibliográfica

1. Breve revisão da anatomia do olho

1.1 O globo ocular

O globo ocular ocupa por inteiro a órbita óssea (a pequena quantidade de espaço existente entre os dois encontra-se preenchida por músculos, fáscia e gordura) (Diesem, 1986b). A sua função consiste em receber os raios luminosos, convertê-los em impulsos nervosos e transmiti-los aos centros superiores do cérebro (Diesem, 1986a). É constituído por três túnicas dispostas concentricamente: a camada externa, formada pela esclera ou esclerótica e pela córnea; a camada média, designada úvea ou túnica vascular e formada pela coróide, corpo ciliar e íris; e a camada interna ou retina. Conservado na sua posição normal pela zónula ciliar (estrutura que se insere no corpo ciliar), localiza-se o cristalino, estrutura biconvexa e transparente, responsável pela focagem dos objectos. Para além das três túnicas concêntricas, o globo ocular compreende ainda três compartimentos: a câmara anterior, situada entre a íris e a córnea; a câmara posterior, entre a íris e o cristalino; e a câmara vítrea, localizada atrás do cristalino e delimitada pela retina (Junqueira & Carneiro, 2004). A câmara anterior comunica com a câmara posterior através da pupila, sendo ambas preenchidas pelo humor aquoso. A câmara vítrea contém o corpo vítreo (fig. 1) (Diesem, 1986a).

Fig. 1 Anatomia do globo ocular (adaptado de Diesem, 1986a)



1.1.1 A córnea

A córnea forma a porção anterior da túnica fibrosa, ocupando cerca de 30% desta camada (Diesem, 1986b). Localiza-se na continuação da esclera, à qual se une no limbo esclerocorneano (Diesem, 1986a). É transparente, não apresentando vasos sanguíneos

nem tecido linfóide. Possui, no entanto, uma rede bem desenvolvida de nervos sensitivos (Crispin, 2008b). A sua nutrição realiza-se por difusão a partir do humor aquoso e dos vasos sanguíneos do limbo, recebendo oxigénio do ambiente exterior (Young & Heath, 2001). A película lacrimal desempenha igualmente um papel importante na nutrição da córnea, contribuindo ainda para a sua lubrificação e protecção (Crispin, 2008c).

Microscopicamente, a córnea encontra-se dividida em cinco camadas: epitélio anterior, membrana limitante anterior, substância própria ou estroma, membrana de Descemet e endotélio (Carrington et al., 1992 citado por Crispin, 2008b). O epitélio anterior é hidrofóbico, não permitindo a aderência da fluoresceína. Este corante fixa-se, no entanto, ao estroma hidrofílico, detectando a presença de úlceras corneanas, nas quais ocorre efracção do epitélio com consequente exposição do estroma (fig. 2) (Mould, 2008).

Fig. 2 Coloração pela fluoresceína de uma úlcera da córnea que afecta o olho direito (cedido por Esmeralda Delgado)



Por ser transparente, a córnea permite que a luz penetre no globo ocular, percorrendo as câmaras oculares até alcançar a retina (Cunningham, 2004). Essa transparência deve-se à ausência de queratinização do epitélio anterior, à natureza lamelar das fibras de colagénio e à ausência de vasos sanguíneos e pigmento. O estado de desidratação da córnea, mantido pelo epitélio anterior e endotélio, e a sua abundante inervação, que a protege de traumatismos, também contribuem para conservar esta particularidade (Samuelson, 1999 citado por Moore, 2005). Qualquer factor que interfira com a arquitectura normal do estroma, contribua para a migração de vasos sanguíneos, se associe à deposição de pigmento ou predisponha para edema da córnea, conduz à perda desta transparência e indica doença corneana (Moore, 2005).

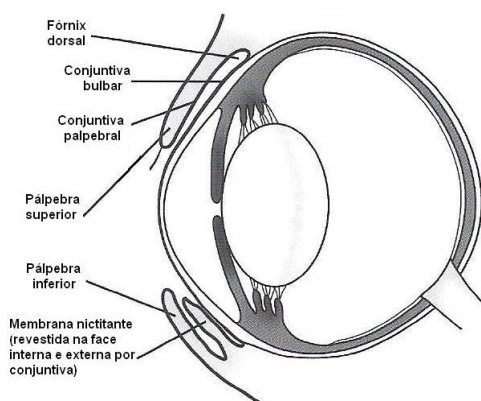
1.2 Os órgãos oculares acessórios

Os órgãos oculares acessórios são: a fáscia orbital, os músculos extra-oculares, as pálpebras, a membrana nictitante, a conjuntiva e o aparelho lacrimal (Diesem, 1986a).

1.2.1 A conjuntiva

Consiste numa membrana mucosa de pigmentação variável que se divide em três porções. A *conjuntiva nictitante* reveste a face interna e externa da membrana nictitante. A *conjuntiva palpebral* reveste a face interna das pálpebras superior e inferior, reflectindo-se nos fórnices dorsal e ventral para se continuar sobre o globo ocular sob a designação de *conjuntiva bulbar*, a qual cobre a superfície anterior da esclera e episclera (fig. 3) (Crispin, 2008a). Histologicamente, é constituída por um epitélio não queratinizado com células caliciformes e pelo estroma subjacente. O estroma compreende uma camada superficial, com tecido linfóide, e uma camada profunda, onde encontramos tecido conjuntivo, nervos e vasos sanguíneos (Crispin, 2008a).

Fig. 3 Anatomia da conjuntiva (Adaptado de Crispin, 2008a).



2. A coriza felina

2.1 Epidemiologia e sinais clínicos

A coriza felina é uma doença infecciosa comum, que ocorre com maior frequência nos animais jovens, nos indivíduos imunodeprimidos (Nelson & Couto, 2006) e em ambientes com elevadas densidades populacionais, tais como gatis, estabelecimentos de criação e casas com um grande número de gatos (Gaskell, Dawson & Radford, 2006). Leva ao desenvolvimento de rinite, faringite e queratoconjuntivite (Drazenovich et al., 2009), caracterizando-se pela presença de espirros, febre, corrimento nasal seroso a mucopurulento, conjuntivite, corrimento ocular, hipersalivação, inapetência e desidratação. Podem ainda surgir úlceras corneanas, pneumonia, úlceras da cavidade oral e poliartrite, dependendo dos agentes envolvidos e da gravidade da infecção (Nelson & Couto, 2006). Em geral, a morbidade é elevada e a mortalidade é baixa (Ramsey & Tennant, 2001).

2.2 Etiologia

O herpesvírus felino-1 (HVF-1) e o calicivírus felino (CVF) são responsáveis por cerca de 90% dos casos de coriza (Nelson & Couto, 2006). A *Bordetella bronchiseptica* também pode actuar como agente patogénico primário (Gaskell et al., 2006). A *Chlamydophila felis* é outro dos agentes causais, podendo levar ao aparecimento de sintomatologia respiratória ligeira, mas tendo como principal manifestação clínica a conjuntivite (Cai et al., 2002; Masubuchi et al., 2002). Quanto aos *Mycoplasma* spp., não existem ainda provas de que possam desempenhar um papel primário (Gaskell et al., 2006), embora vários estudos sugiram que isso por vezes ocorre (Spindel, Veir, Radecki & Lappin, 2008; Veir, Ruch-Gallie, Spindel & Lappin, 2008), particularmente em casos de conjuntivite (Low, Powell, Veir, Hawley & Lappin, 2007) (fig. 4). Com alguma frequência, surgem infecções mistas (Rand, 2006).

Outros organismos têm sido isolados, atribuindo-se-lhes uma importância secundária (Nelson & Couto, 2006). O reovírus felino, identificado ocasionalmente em gatos, levou ao aparecimento de sinais conjuntivais e respiratórios após inoculação experimental, não parecendo ter, contudo, importância na prática clínica. Também o vírus da varíola bovina, que causa predominantemente lesões cutâneas, induz por vezes um quadro semelhante (Gaskell et al., 2006). Encontra-se ainda descrita na literatura uma associação esporádica entre o coronavírus felino e o desenvolvimento de formas ligeiras de coriza (Ramsey & Tennant, 2001). Adicionalmente, várias bactérias, como o *Staphylococcus* spp, o *Streptococcus* spp, a *Pasteurella multocida* e a *Escherichia coli*, podem intervir como agentes oportunistas (Gaskell, Radford & Dawson, 2004).

Fig. 4 Conjuntivite crónica. Diagnóstico diferencial: HVF-1, *C. felis* e *Mycoplasma* spp.
(Original).



2.3 Diagnóstico

O diagnóstico de coriza baseia-se normalmente nos dados da anamnese e do exame clínico (Nelson & Couto, 2006). Pode realizar-se um diagnóstico etiológico presuntivo com base nos sinais clínicos – por exemplo, o predomínio de ulceração oral no quadro clínico sugere infecção por CVF, enquanto espirros frequentes acompanhados de sinais respiratórios e

conjuntivais graves podem indicar HVF-1, e uma conjuntivite grave sem outros sinais leva à suspeita de *C. felis*. No entanto, o diagnóstico etiológico definitivo implica o recurso a métodos complementares de diagnóstico (Gaskell et al., 2006). O emprego destes métodos justifica-se nos gatis, abrigos e criadores de gatos, onde o conhecimento do agente causal contribui para o delineamento de estratégias de manejo, e nos casos individuais que não respondam à terapêutica sintomática convencional ou que manifestem episódios recorrentes de coriza (Hurley & Sykes, 2003).

2.4 Tratamento

É importante ter atenção aos cuidados de suporte, encorajando-se a alimentação, se necessário com comida mais palatável, e removendo-se o muco e os exsudados da face e narinas. Se a congestão nasal for grave, pode recorrer-se a descongestionantes tópicos como a fenilefrina e a oximetazolina (Nelson & Couto, 2006) e, nas manifestações crónicas, os agentes mucolíticos (como a bromexina) podem ser úteis. Outro método para eliminar as secreções em excesso é a realização de nebulizações. Os casos mais graves requerem hospitalização e fluidoterapia, sendo indicada a colocação de um tubo de gastrotomia ou nasogástrico caso se verifique anorexia prolongada (Gaskell et al., 2006). Em animais com sintomatologia grave, recomenda-se a instituição de antibioterapia de largo espectro. Naqueles que apresentam manifestações oculares, deve aplicar-se a terapêutica apropriada (Nelson & Couto, 2006), que será descrita pormenorizadamente na secção dedicada às manifestações oculares.

2.5 Profilaxia

As vacinas contra o HVF-1 e o CVF encontram-se disponíveis há vários anos (Gaskell et al., 2006). A primovacinação dos gatinhos deve incluir duas administrações – a primeira entre as oito e as dez semanas de idade e a segunda três a quatro semanas depois (Nelson & Couto, 2006). Tradicionalmente, recomenda-se fazer o reforço da vacina todos os anos (Gaskell et al., 2006); no entanto, existem dados que indicam que a imunidade pode prolongar-se durante mais de um ano (Mouzin, Lorenzen, Haworth & King, 2004; Scott & Geissinger, 1999). Assim, e tendo em vista a possibilidade de desenvolvimento de sarcomas nos locais de vacinação (De Man & Ducatelle, 2007), o intervalo de revacinação poderá estender-se até três anos. O European Advisory Board on Cat Diseases recomenda que todos os gatinhos recebam a primovacinação contra o HVF-1, realizando-se o primeiro reforço após um ano. Subsequentemente devem fazer-se reforços anuais nos indivíduos de elevado risco. Naqueles em que o risco é baixo (gatos sem acesso ao exterior e sem possibilidade de contactar com outros gatos), a revacinação deve ser feita com intervalos de três anos. Os animais adultos com estatuto vacinal desconhecido devem receber uma primovacinação composta por duas administrações com intervalo de duas a quatro

semanas. Os indivíduos que sofreram anteriormente episódios de coriza também devem ser vacinados (Thiry et al., 2009). As mesmas regras se aplicam à vacinação para o CVF, recomendando-se, para a primovacinação, uma terceira administração às 16 semanas em casos de alto risco (Radford et al., 2009).

Existe ainda uma vacina intranasal para a *B. bronchiseptica* e uma vacina parenteral contra *C. felis*, mas estas apenas se recomendam em situações de risco muito elevado, como é o caso dos animais que vão para um gatil (Nelson & Couto, 2006). Para o *Mycoplasma* spp. não se encontra disponível qualquer produto (Rand, 2006).

Juntamente com a profilaxia médica, é necessário ter atenção às medidas de profilaxia sanitária, que são especialmente importantes em locais com um grande número de gatos. O controlo dos surtos de coriza nesses estabelecimentos é complexo, tornando-se necessário implementar medidas específicas, que incluem, além da vacinação, a separação dos animais mais jovens, o isolamento dos indivíduos infectados, a limpeza e desinfecção correctas das instalações e a ventilação adequada do ambiente. Para a prevenção no gato individual, deve evitar-se a exposição aos agentes infecciosos, impedindo o livre acesso ao exterior. Os cuidados de saúde gerais contribuem para o bom estado geral do animal, fortalecendo a imunidade (Nelson & Couto, 2006).

3. Coriza felina: manifestações oculares de cada agente etiológico

3.1 Herpesvírus felino-1 (HVF-1)

3.1.1 Introdução

3.1.1.1 Caracterização do agente

O HVF-1 pertence à família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae*, género *Varicellovirus* (Davison et al., 2009). O seu genoma é constituído por DNA (*deoxyribonucleic acid*, ácido desoxirribonucleico) de cadeia dupla e apresenta um invólucro lipo-glicoproteico que lhe confere uma relativa fragilidade no meio ambiente, sendo altamente susceptível aos efeitos dos desinfectantes comuns. Sobrevive até dezoito horas em condições de humidade relativa elevada e menos tempo em ambiente seco, mostrando-se relativamente instável sob a forma de aerossol. Apenas se conhece um serótipo, havendo poucas variações entre as estirpes quando se realiza uma análise por enzimas de restrição (Gaskell et al., 2006).

3.1.1.2 Epidemiologia

Apresenta uma distribuição mundial e pensa-se que infecta somente animais da família *Felidae* (Ramsey & Tennant, 2001), sendo o gato doméstico o principal hospedeiro (Thiry et al., 2009). Existem dados serológicos que indicam que pode infectar vários felídeos selvagens (Driciru et al., 2006; Filoni et al., 2006; Munson et al., 2004).

O HVF-1 é libertado através das secreções orais, nasais e oculares, dando-se a transmissão principalmente por contacto directo com animais infectados que se encontrem em fase de excreção (ou seja, indivíduos com infecção aguda e portadores que sofrem reactivação da infecção latente). Uma vez que o tempo de sobrevivência fora do animal é limitado, a transmissão indirecta, através de fomites e da contaminação do ambiente, apenas ocorre a curto prazo, considerando-se relevante nos casos em que os indivíduos são mantidos em grande número num ambiente confinado. Na infecção aguda, a excreção viral inicia-se vinte e quatro horas após a infecção e persiste durante uma a três semanas (Gaskell et al., 2006). As portas de entrada são as vias oral, nasal e conjuntival (Gaskell et al., 2006). Após a infecção primária, que ocorre normalmente no animal jovem (Maggs, 2005), cerca de 80% dos gatos tornam-se portadores (Crispin, 2005) para o resto da vida. O estado de *portador* é caracterizado por latência no gânglio trigémeo (Ramsey & Tennant, 2001), ocorrendo reactivação viral espontânea ou após a administração de glucocorticóides ou a ocorrência de períodos de stress, tais como viagens, mudança de ambiente, parto e lactação. A reactivação viral pode ainda atribuir-se, em alguns animais, à imunossupressão sistémica causada pelo FIV (*feline immunodeficiency virus*, vírus da imunodeficiência felina) ou pelo FeLV (*feline leukemia virus*, vírus da leucemia felina) em animais co-infectados com estes vírus (Andrew, 2001). Nesta fase, o animal excreta activamente o vírus e desenvolve, em alguns casos, sinais de doença (Gaskell et al., 2006), o que se designa por recrudescência (Thiry et al., 2009). O parto e a lactação, ao precipitar a excreção viral na gata, levam à infecção da sua descendência, estando a gravidade do quadro clínico desenvolvido pelos gatinhos dependente dos níveis de anticorpos de origem materna (Gaskell et al., 2006).

3.1.1.3 Patogenia

Após entrar por via oral, nasal ou conjuntival, o HVF-1 replica-se predominantemente na mucosa do septo nasal, turbinados, nasofaringe, tonsilas e conjuntiva, surgindo áreas de necrose epitelial multifocal com infiltração de neutrófilos e deposição de fibrina (Gaskell et al., 2006; Thiry et al., 2009). Através dos nervos sensoriais, o vírus atinge os neurónios, particularmente os do gânglio trigémeo, onde se dá o fenómeno de latência (Thiry et al., 2009). Em alguns casos, a acção viral leva a alterações osteolíticas dos ossos turbinados, que podem resolver-se ou tornar-se permanentes. A infecção primária do pulmão é rara, sendo mais frequente a infecção bacteriana secundária, que também pode ocorrer nos seios paranasais. A virémia é igualmente rara, uma vez que o agente se multiplica

preferencialmente em áreas do organismo onde a temperatura é mais baixa (como o tracto respiratório). A infecção de todo o organismo, com doença generalizada, observa-se por vezes nos gatinhos recém-nascidos e em animais debilitados (Gaskell et al., 2006).

3.1.1.4 Quadro clínico

Em animais susceptíveis, a infecção pelo HVF-1 causa, após um período de incubação de dois a seis dias (Rand, 2006), doença aguda do tracto respiratório superior, com elevada morbidade e reduzida mortalidade. Os sinais clínicos, que geralmente se resolvem em dez a vinte dias, consistem inicialmente em depressão, espirros, inapetência e febre. Segue-se o aparecimento de corrimento seroso nasal e ocular, indicando rinite e conjuntivite (Gaskell et al., 2006). Posteriormente, devido a infecção bacteriana secundária, o corrimento oculonasal torna-se purulento (Thiry et al., 2009), podendo haver acumulação de exsudado seco em redor das narinas e pálpebras (fig. 5). Nos casos mais graves, surge tosse e dispneia. Ocasionalmente desenvolve-se pneumonia viral em animais muito jovens ou debilitados. A ulceração da cavidade oral é rara (Gaskell et al., 2006).

Fig. 5 Infecção aguda pelo HVF-1 em gatinho com 2 meses de idade (cedido por Esmeralda Delgado)



Outra manifestação da infecção por este herpesvírus é a queratite ulcerativa, considerando-se as úlceras dendríticas patognomónicas para a infecção por HVF-1. Quando o vírus ganha acesso ao estroma da córnea, desenvolve-se uma resposta imunológica, que causa o aparecimento de queratite estromal (Crispin, 2008b). Pensa-se também que alguns casos de queratite eosinofílica e de sequestro da córnea estejam relacionados com este agente (Nasisse, Glover, Moore & Weigler, 1998), e tem sido sugerida uma associação com a ocorrência de uveíte (Maggs, Lappin & Nasisse, 1999a). Encontram-se ainda descritos casos de dermatite e estomatite provocadas pelo HVF-1 (Holland, Outerbridge & Affolter, 2006; Lee, Bosward & Norris, 2010).

Por vezes, surgem alterações reprodutivas, como reabsorção fetal e aborto, caso a fêmea seja infectada durante a gestação. Alternativamente, os gatinhos podem nascer infectados ou desenvolver sinais clínicos pouco tempo depois do parto (Rand, 2006).

Em alguns casos, a infecção aguda causa lesão permanente da mucosa e dos turbinados, podendo desenvolver-se formas crónicas de rinite bacteriana, osteomielite dos turbinados, sinusite e conjuntivite. As raças braquicefálicas mostram maior tendência para estas complicações (Gaskell et al., 2006).

Alguns animais adultos, quando ocorre reactivação da infecção latente, apresentam sinais clínicos (fig. 6) (Thiry et al., 2009), sendo a queratoconjuntivite o mais comum. Nesta fase, a sintomatologia respiratória é pouco frequente (Crispin, 2008a). É importante salientar que os animais afectados de forma crónica ou recorrente pelo HVF-1 constituem, na realidade, uma pequena minoria dentro da população infectada. Estes indivíduos desenvolvem provavelmente respostas imunológicas diminuídas ou, pelo contrário, invulgarmente exuberantes, na presença de estirpes virais comuns (Maggs, 2005).



Fig. 6 Reactivação de infecção herpética latente num gato adulto. Este animal apresentava queratoconjuntivite, espirros e corrimento nasal (Original).

3.1.1.5 Métodos complementares de diagnóstico

Encontram-se disponíveis vários testes de diagnóstico, apresentando cada um as suas limitações. É importante ter em conta que um resultado negativo não exclui a possibilidade de infecção herpética (Stiles, 2003).

3.1.1.5.1 Métodos de detecção viral

Os gatos com infecção aguda, em que o vírus é excretado em grande quantidade, tornando-se a sua detecção relativamente fácil, mostram normalmente sinais clínicos característicos e auto-limitantes. Existe, assim, pouca necessidade de realizar um diagnóstico definitivo. Paradoxalmente, nos animais com doença crónica, em que o quadro clínico é ambíguo, revestindo-se a identificação viral de maior importância, a quantidade de vírus presente é reduzida, tornando-se a sua detecção mais difícil (Maggs, 2005). Os métodos disponíveis são o isolamento viral, a imunofluorescência e o PCR (*polymerase chain reaction*, reacção em cadeia da polimerase) (Stiles, 2003).

O isolamento viral representa o *Gold Standard* no diagnóstico dos alphaherpesvirus (Maggs, 2005), realizando-se a partir de zaragatoas orofaríngeas ou conjuntivais (Gaskell & Dawson,

2005), que são colocadas em meio de transporte viral (Gaskell, Dawson, Radford & Thiry, 2007), refrigeradas e enviadas com a maior brevidade possível para o laboratório. Uma vez que o HVF-1 se replica em pouco tempo, produzindo um efeito citopático característico, esta técnica processa-se com relativa celeridade e é bastante simples (Maggs, 2005). No entanto, requer a presença de partículas virais viáveis, pelo que a colheita e processamento das amostras devem ser realizadas com os cuidados apropriados (Hartley, 2010a). Assim, apesar de mostrar uma boa sensibilidade, o isolamento viral não é utilizado rotineiramente na prática clínica, devido às dificuldades logísticas no transporte e processamento das amostras (Maggs, 2005).

A imunofluorescência, pelo contrário, apresenta uma menor sensibilidade, mercê da avaliação subjectiva realizada pelo pessoal de laboratório (Andrew, 2001). Tem, porém, face ao isolamento, a vantagem de não requerer a presença de vírus viável, pelo que a colheita e transporte do material não se encontram sujeitos a tantos cuidados (Maggs et al., 1999b). As amostras consistem normalmente em raspagens conjuntivais ou corneanas, ou em biopsias, sendo-lhes adicionados anticorpos fluorescentes que detectam, de forma directa ou indirecta, epitopos do HVF-1 à superfície das células infectadas (Maggs, 2005). A aplicação de corantes vitais na córnea, particularmente a fluoresceína, pode resultar no aparecimento de falsos positivos (Hartley, 2010a), pelo que a amostra deve ser obtida antes de se instilar este corante (Thiry et al., 2009). Em infecções crónicas, os epitopos virais podem encontrar-se previamente ligados a anticorpos produzidos pelo próprio organismo, pelo que não reagem com os anticorpos fluorescentes. Devido às suas limitações e à disponibilidade de métodos alternativos, a aplicação da imunofluorescência na prática clínica é limitada (Maggs, 2005).

O PCR permite amplificar quantidades mínimas de um determinado fragmento de DNA (Murphy, Gibbs, Horzinek & Studdert, 1999), tendo revolucionado o diagnóstico laboratorial de numerosos agentes infecciosos, incluindo o HVF-1 (Andrew, 2001). Qualquer amostra biológica pode ser utilizada para detectar o vírus; no entanto, devido à sua natureza intracelular obrigatória, esta detecção será tanto mais eficiente quanto maior for o número de células do hospedeiro colhidas. Assim, é mais provável obter resultados positivos numa amostra obtida por biopsia do que numa raspagem; por sua vez, a raspagem apresenta maior sensibilidade do que um esfregaço efectuado com uma zaragatoa (Maggs, 2005). Normalmente, utiliza-se o material proveniente de uma raspagem ou biopsia conjuntival, de esfregaços orofaríngeos (Stiles, 2003) ou conjuntivais (Burgesser et al., 1999) ou ainda o epitélio corneano proveniente do desbridamento de uma úlcera (Stiles, 2003).

Actualmente, o PCR constitui o método de eleição na detecção do HFV-1 (Burgesser et al., 1999), devido à sua superior sensibilidade e especificidade (Crispin, 2008a). Assim, tem vindo a substituir o isolamento viral em muitos laboratórios (Gaskell et al., 2007), mostrando-se também mais rápido (Thiry et al., 2009). A sua grande sensibilidade faz ainda com que

seja ideal em estudos epidemiológicos, onde se pode determinar a prevalência de animais infectados na população. Contudo, clinicamente, a especificidade do diagnóstico pode ser sacrificada (Burgesser et al., 1999), devido à capacidade de detecção de cargas virais muito reduzidas (Maggs, 2005), e que podem ou não ser viáveis (Clarke, Kado-Fong & Maggs, 2006, citado por Hartley, 2010a), questionando-se com frequência a sua responsabilidade no desenvolvimento do quadro clínico (Maggs, 2005). A interpretação de um resultado positivo torna-se assim mais difícil (Burgesser et al., 1999). Adicionalmente, a ocorrência de falsos positivos por contaminação é mais provável, devendo assim tomar-se uma atenção redobrada ao cumprimento dos protocolos laboratoriais (Maggs, 2005).

3.1.1.5.2 Serologia

Uma vez que a maioria dos gatos já sofreu exposição ao vírus ou realizou vacinação, a serologia não é considerada útil no diagnóstico (Ramsey & Tennant, 2001).

3.1.1.6 Tratamento

O tratamento específico para o HVF-1 inclui os antivirais tópicos oculares, como a trifluridina e a idoxuridina (Nelson & Couto, 2006), o interferão (IFN), e a lisina, que é dada por via oral (Crispin, 2008b). Se existir úlcera da córnea, encontra-se indicado o seu tratamento rotineiro (Nelson & Couto, 2006), tornando-se por vezes necessário recorrer à cirurgia (Crispin, 2008b).

3.1.1.7 Profilaxia médica

As vacinas disponíveis para o HVF-1 são combinadas com o CVF. Existem três tipos: vacinas vivas atenuadas de administração parenteral, vacinas vivas atenuadas de administração intranasal e vacinas inactivadas de administração parenteral (Gaskell et al., 2006). As vacinas vivas parenterais são utilizadas na maioria dos gatos, normalmente por via subcutânea (Nelson & Couto, 2006), tendo as vacinas vivas intranasais a vantagem de conferir uma melhor e mais rápida protecção, pelo que são úteis em situações de elevado risco. As vacinas inactivadas não apresentam a possibilidade de reversão para virulência, sendo indicadas na profilaxia de animais residentes em colónias livres do vírus, na vacinação das fêmeas gestantes (Gaskell et al., 2006) e em gatos co-infectados pelo FIV ou pelo FeLV (Nelson & Couto, 2006). Em Portugal, segundo o Simposium Veterinário 2006, estão disponíveis seis vacinas multivalentes, para administração por via subcutânea, que contêm, entre outros agentes, o herpesvírus felino vivo atenuado, encontrando-se o CVF atenuado em três delas e inactivado nas outras três. Existe ainda uma vacina de glicoproteínas do HVF-1, com proteína do CVF, além de outras valências, que é também de aplicação subcutânea (Comissão especializada para a saúde animal [CESA], 2006).

É importante salientar que a vacinação protege da doença, minimizando os sinais clínicos, mas não impede a infecção e o desenvolvimento do estado de portador (Gaskell et al., 2006).

3.1.2 Manifestações oculares

O HVF-1 é um importante agente patogénico ocular (Crispin, 2008a), podendo originar doença na córnea, na conjuntiva ou em ambas as estruturas (Andrew, 2001). A sua responsabilidade no desenvolvimento de queratoconjuntivite felina é conhecida, particularmente no que diz respeito às úlceras dendríticas, que são patognomónicas (Crispin, 2008b), existindo outras manifestações oculares, nomeadamente a uveíte, a queratite eosinofílica e o sequestro da córnea, cuja relação causal com este vírus não foi ainda comprovada (Andrew, 2001; Gaskell et al., 2006). O simbléfaro e a queratoconjuntivite seca são sequelas possíveis da queratoconjuntivite herpética (Crispin, 2008a).

3.1.2.1 Conjuntivite

A infecção aguda pelo HVF-1 resulta normalmente no aparecimento de conjuntivite (Gaskell et al., 2006) com envolvimento bilateral (Andrew, 2001).

Nos gatinhos recém-nascidos, é típico o desenvolvimento de *ophthalmia neonatorum*, uma conjuntivite grave que ocorre antes da abertura das pálpebras, com infecção bacteriana secundária. Esta conjuntivite neonatal leva a necrose epitelial, a qual pode resultar no aparecimento de simbléfaro, isto é, na adesão das porções palpebral, bulbar ou nictitante da conjuntiva entre si ou à córnea, ou em ulceração e perfuração da córnea. O simbléfaro pode ocasionar estenose ou oclusão dos pontos lacrimais, impedindo a normal drenagem das lágrimas e causando epífora persistente, e oclusão dos ductos da glândula lacrimal, que é uma das causas propostas para o aparecimento de queratoconjuntivite seca (Crispin, 2008a).

Nos gatinhos mais velhos e gatos adolescentes surge usualmente conjuntivite aguda bilateral, com desconforto ocular, quemose marcada e corrimento ocular (inicialmente seroso, tornando-se posteriormente purulento) (Crispin, 2008a). Por vezes, a replicação viral leva mesmo a ulceração da conjuntiva, tomando o corrimento ocular uma aparência serossanguinolenta (Maggs, 2005). Na maioria dos casos, ocorre recuperação em dez a vinte dias com ausência de sequelas oculares (Andrew, 2001).

A conjuntivite crónica (fig. 7) é típica dos gatos adultos, podendo resultar de reactivação do vírus latente (Crispin, 2008a). Pode também ser consequência de lesão permanente da mucosa conjuntival aquando da infecção viral aguda, desenvolvendo-se conjuntivite bacteriana crónica (Gaskell et al., 2006). A manifestação clínica mais comum é o corrimento ocular unilateral ou bilateral - amiúde intermitente - acompanhado de hiperémia conjuntival moderada (Crispin, 2008a).

Fig. 7 Queratoconjuntivite herpética crónica (cedido por Esmeralda Delgado)



O prognóstico para a recuperação das lesões é mais favorável nas infecções agudas do que nos casos crónicos ou recorrentes (Crispin, 2008a).

3.1.2.1.1 Tratamento

O tratamento da conjuntivite herpética aguda consiste na administração tópica de oxitetraciclina (Crispin, 2008a) ou cloranfenicol (Slatter, 2001), para prevenir a infecção bacteriana secundária, e na prestação de cuidados de suporte, nomeadamente a remoção periódica dos exsudados conjuntivais (Crispin, 2008a). A oxitetraciclina deve ser aplicada quatro vezes por dia durante três a quatro semanas. O cloranfenicol é administrado na dose de uma gota quatro vezes por dia durante um período máximo de sete dias (Plumb, 2005). Em Portugal, a oxitetraciclina encontra-se disponível sob a forma de uma pomada oftálmica (Terricil ®) (Infarmed, 2010f), e o cloranfenicol constitui o princípio activo do Clorocil ®, que se pode encontrar em pomada (Infarmed, 2010b) ou em colírio (Infarmed, 2010a). A lisina, dada por via oral, pode também mostrar-se útil (Maggs, 2005), uma vez que inibe a replicação do HVF-1 (Stiles, 2003).

Nos casos de *ophthalmia neonatorum*, deve abrir-se prematuramente as pálpebras com o auxílio de uma tesoura de tenotomia de ponta romba, após o que se recomenda tratar as infecções bacterianas secundárias e realizar a lavagem frequente dos olhos e das pálpebras para prevenir recorrências (Crispin, 2008a).

Na conjuntivite crónica, Slatter (2001) indica a instituição de antibioterapia tópica e a lavagem regular dos olhos. Nasisse (2000), contudo, não recomenda a aplicação de antibiótico, preferindo a suplementação oral com lisina. Se os sinais persistirem durante mais de quatro semanas, este autor advoga o uso de um antiviral, que pode ser associado a um IFN, ou mesmo a administração tópica de uma vacina viva modificada.

A suplementação com lisina é recomendada na conjuntivite herpética (Slatter, 2001) porque, *in vitro*, concentrações elevadas de L-lisina reduzem a replicação do HVF-1 em meios com baixos níveis de arginina (Maggs, Collins, Thorne & Nasisse, 2000). O reconhecido antagonismo entre a lisina e a arginina gerou, no início, preocupação relativamente à aplicação prática desta descoberta, porque os gatos são muito sensíveis à deficiência em

arginina (Maggs, 2005). No entanto, Fascetti, Maggs, Kanchuk, Clarke e Rogers (2004) não relataram, em indivíduos suplementados com lisina, diminuição na concentração plasmática de arginina ou sinais clínicos atribuíveis a deficiências neste aminoácido. Verificou-se, contudo, uma redução na ingestão de alimento nos animais que receberam os dois níveis mais elevados de suplementação (111 g/kg e 113 g/kg), a qual se pensa ter resultado de toxicidade. Até à concentração de 86 g de lisina por kg de alimento, ela foi, não obstante, considerada segura. Quanto aos estudos relacionados com a eficácia no combate à infecção, os resultados são variáveis – em dois gatis e uma colónia, a lisina não foi bem sucedida no controlo dos casos de coriza (Drazenovich et al., 2009; Maggs et al., 2007; Rees & Lubinski, 2008). Stiles, Townsend, Rogers e Krohne (2002), pelo contrário, atribuem a este aminoácido um efeito protector, uma vez que, num estudo realizado pelos autores, atenuou a gravidade dos sinais clínicos nos gatos a que foi administrado, em comparação com os gatos que receberam um placebo. Dado que a suplementação foi iniciada seis horas antes de se inocular os animais com HVF-1, sugere-se que a L-lisina possa desempenhar um papel mais importante na prevenção e tratamento precoce do que no manejo de situações crónicas. Maggs (2005) recomenda a administração, em caso de doença aguda, de 500 mg de lisina, por via oral, de doze em doze horas. Nos gatinhos, a dose de 250 mg é mais adequada (Stiles, 2003). Esta terapêutica pode também servir como medida profiláctica a longo termo nos animais que apresentam sinais crónicos recorrentes (Maggs, 2005), indicando-se a mesma posologia que para a doença aguda. A fim de evitar problemas gástricos, a lisina deve ser dada com alimento (Stiles, 2003). A suplementação deve estender-se por um período mínimo de quatro semanas (Nasisse, 2000).

Outras terapêuticas têm sido investigadas, nomeadamente a suplementação oral com *Enterococcus faecium* SF68 para fortalecer a imunidade, diminuindo a reactivação viral e o aparecimento de conjuntivite em animais com infecção latente pelo HVF-1. Os resultados obtidos após a sua administração experimental parecem encorajadores, embora sejam necessários mais estudos para determinar a eficácia clínica deste probiótico (Lappin, Veir, Satyaraj & Czarnecki-Maulden, 2009). Também a lactoferrina, uma glicoproteína produzida pelas células epiteliais das mucosas de muitos mamíferos, tem sido sugerida no combate à infecção pelo HVF-1 (Maggs, 2005), uma vez que, num ensaio realizado *in vitro*, a replicação viral foi inibida pela lactoferrina bovina. Torna-se necessário, contudo, realizar mais estudos para determinar a eficácia da sua aplicação tópica em gatos com doença ocular herpética (Beaumont, Maggs & Clarke, 2003).

3.1.2.2 Queratite

A queratite ulcerativa felina é um motivo comum de apresentação à consulta e a infecção pelo HVF-1 representa provavelmente a sua causa mais frequente (Hartley, 2010a). Tem sido inclusivamente sugerido que, na espécie felina, todas as úlceras corneanas devem ser

atribuídas a este vírus até prova em contrário (Maggs, 2005). Trata-se de uma afecção que ocorre principalmente nos gatos adultos, resultando normalmente de reactivação viral (Andrew, 2001), embora também possa surgir durante a infecção viral aguda. Na maioria dos casos, acompanha-se de blefarospasmo, com epífora ou corrimento ocular seroso. Alguns animais afectados são positivos para infecção por FIV ou por FeLV - nestes indivíduos, a queratite herpética parece resultar de uma infecção oportunista num hospedeiro imunocomprometido (Crispin, 2008b).

Na fase inicial, a queratite consiste em opacidades puntiformes discretas e superficiais, que resultam da invasão e replicação do vírus nas células epiteliais da córnea (estas células sofrem posteriormente necrose). Mais tarde surgem erosões lineares ramificadas que se designam úlceras dendríticas e se consideram patognomónicas para a infecção por herpesvírus felino-1. Quando várias úlceras dendríticas aumentam de tamanho e coalescem, dão origem a úlceras geográficas, que são erosões superficiais (Crispin, 2008b) semelhantes a mapas (Slatter, 2001). Ocasionalmente, estas úlceras podem progredir e envolver o estroma ou mesmo levar ao aparecimento de descemetocélio ou perfuração da córnea (Nasisse, 1982 citado por Hartley, 2010a).

As úlceras são identificadas com a ajuda da fluoresceína, devendo observar-se a córnea na escuridão com incidência de uma luz azul de um filtro de cobalto após aplicação do corante (Crispin, 2008b). De facto, não é possível visualizar as úlceras dendríticas sem o recurso a esta técnica (Hartley, 2010a). Contudo, a replicação do HVF-1 nem sempre resulta na perda de todas as camadas de epitélio e exposição do estroma, pelo que a fluoresceína não identifica, em alguns casos, a presença de infecção viral activa. Nessas situações, o rosa bengala é útil para evidenciar as células epiteliais mortas e desvitalizadas (Maggs, 2005) – no entanto, deve ser utilizado com precaução, uma vez que se mostra mais irritante para o olho (Crispin, 2008b) e tem efeitos epiteliotóxicos. A fluoresceína não cora a membrana de Descemet – assim, a ausência de captação deste corante na base de uma úlcera cujas margens estão impregnadas é patognomónica para a presença de descemetocélio (Hartley, 2010a).

Por vezes, graças aos seus efeitos citopáticos sobre o epitélio da córnea e à supressão da imunidade local, o vírus alcança o estroma. Desenvolve-se então uma resposta imunológica contra os antigénios virais, o que dá origem a uma queratite estromal (Crispin, 2008b). Esta é precedida por ausência prolongada do epitélio corneano (Nasisse, Guy, Davidson, Sussman & Fairly, 1989 citado por Andrew, 2001) e opõe-se à queratite epitelial, caracterizada pelas úlceras dendríticas e geográficas. É especialmente comum nos animais a que foram administrados corticosteróides (Slatter, 2001), caracterizando-se pela infiltração do estroma com células inflamatórias (principalmente linfócitos). As alterações inflamatórias crónicas, particularmente a fibrose e a neovascularização, podem resultar na opacidade da córnea (Maggs, 2005). Assim, e embora seja menos comum, a queratite estromal é

considerada importante, uma vez que põe em causa a manutenção da transparência da córnea, constituindo uma potencial ameaça à capacidade visual (Nasisse, 1990 citado por Andrew, 2001). A replicação viral é reduzida ou ausente, pelo que as tentativas de isolamento viral podem não ser bem sucedidas. Os agentes antivirais podem assim não se mostrar eficazes quando aplicados isoladamente, devendo ponderar-se a sua associação a uma terapêutica anti-inflamatória (Maggs, 2005).

Raramente, a ulceração provocada pelo HVF-1 evolui para liquefacção da córnea (designada queratomalácia) (Hartley, 2010a). Neste fenómeno, as proteases endógenas, libertadas pelos neutrófilos e células epiteliais corneanas lesionadas, representam uma fonte mais importante de collagenases do que as proteases de origem bacteriana (Ollivier et al., 2007). O estroma assume uma aparência gelatinosa e mostra-se brando e móvel ao toque, podendo surgir um infiltrado leucocitário que lhe confere um aspecto gelatinoso (Hartley, 2010a).

A queratite associada à reactivação viral (fig. 8 e 9) pode ser unilateral ou bilateral e é normalmente mais discreta do que durante a infecção primária, sendo o aparecimento de doença generalizada pouco frequente (Maggs, 2005). Neste processo de reactivação, o vírus, que estabelece latência no gânglio trigémio, alcança, por transporte axonal anterógrado, o olho (Stiles, 2003). Surgem úlceras dendríticas que progridem rapidamente para úlceras geográficas (Nasisse et al., 1989 citado por Hartley, 2010a), sendo a sua resolução mais lenta do que na doença primária. Muitas vezes a evolução é crónica (Maggs, 2005), surgindo neovascularização da córnea. Pode ainda haver infiltração de células inflamatórias (Nasisse et al., 1989 citado por Hartley, 2010a).

Fig. 8 Queratite herpética associada a reactivação viral. Pode observar-se a presença de edema e neovascularização da córnea (cedido por Esmeralda Delgado)



Uma vez que vários estudos sugerem a possibilidade de os herpesvírus estabelecerem latência na córnea de coelhos, ratos e humanos (Abghari & Sulting, 1988 citado por Stiles & Pogradichniy, 2008; O'Brien & Taylor, 1989 citado por Stiles & Pogradichniy, 2008; Kaye et al., 1991 citado por Stiles & Pogradichniy, 2008), coloca-se a hipótese de essa latência

poder ocorrer também nos felinos. Tal fenómeno explicaria a propensão de certos gatos para desenvolver ulceração recorrente da córnea associada ao HVF-1 – o vírus não necessitaria de viajar desde o gânglio trigémeo até ao globo ocular, porque permaneceria sempre na córnea (Stiles & Pogranichniy, 2008). Até ao momento não há, contudo, dados que confirmem esta hipótese. Townsend, Stiles, Guptill-Yoran e Krohne (2004) relatam um estudo em que desenvolveram uma técnica de RT-PCR (*reverse-transcription PCR*, PCR com transcrição reversa) para detectar RNAs (*ribonucleic acid*, ácido ribonucleico) virais associados à fase de latência (designados em inglês por LATs - *Latency associated transcripts*) no gânglio trigémeo e na córnea (Townsend et al., 2004). Os LATs são transcritos a partir de genes precoces imediatos, constituindo provavelmente a forma mais correcta de determinar se o vírus se encontra em verdadeiro estado de latência (Gaskell et al., 2007). Neste estudo, embora se tenha detectado DNA viral, tanto no gânglio trigémeo como na córnea, apenas se detectaram LATs no gânglio trigémeo. Consequentemente, não foi possível provar que o herpesvírus felino estabelece latência na córnea (Townsend et al., 2004). Num trabalho mais recente, foi detectado HVF-1 virulento, ou seja, com capacidade de replicação, em córneas de indivíduos clinicamente normais, não tendo sido possível concluir se este achado representa o estabelecimento de latência corneana do vírus ou de infecção persistente de baixo grau (Stiles & Pogranichniy, 2008).

Fig. 9 Queratite herpética unilateral associada a reactivação viral. Pode observar-se a presença de edema da córnea (Original)



3.1.2.2.1 Tratamento

3.1.2.2.1.1 Agentes antivirais

Na presença de sinais oculares graves, persistentes ou recorrentes, e quando há envolvimento da córnea, particularmente se existe ulceração, recomenda-se a utilização de antivirais (Maggs, 2005), que devem ser administrados durante um período mínimo de duas semanas, continuando-se pelo menos por uma semana após a resolução dos sinais clínicos

(Crispin, 2008b). Numerosos agentes têm sido propostos para o tratamento da queratite herpética, nomeadamente a trifluorotimidina (trifluridina), a idoxuridina, a vidarabina, a bromovinildeoxuridina, o aciclovir, o valaciclovir, o ganciclovir, o penciclovir, o famciclovir, o cidofovir e o foscarnet (Hartley, 2010b). Com excepção do foscarnet, que é um análogo dos pirofosfatos, estes compostos pertencem ao grupo dos análogos de nucleósidos (Coen & Richman, 2007). São na sua maioria de aplicação tópica ocular e mostram-se mais eficazes em situações de queratite ulcerativa aguda, particularmente na sua forma superficial. Os casos crónicos com envolvimento estromal parecem ser resistentes (Crispin, 2008b).

Uma vez que os referidos medicamentos têm acção virustática e não virucida, recomenda-se uma elevada frequência de administração. Esta exigência é normalmente de difícil cumprimento por parte dos proprietários. Além disso, a maioria destes produtos causa irritação local (Andrew, 2001). Muitos gatos não toleram um tratamento tão intensivo, que pode assim, uma vez que o *stress* desempenha um papel importante na patogenia da doença, tornar-se mesmo contraproducente (Hartley, 2010b).

Os análogos de nucleósidos inibem a replicação viral através da inibição da DNA polimerase. Alguns mimetizam os nucleósidos monofosfatos, sendo na realidade análogos de nucleótidos. Após sofrerem fosforilação, normalmente para a forma trifosfato, por acção das enzimas celulares ou virais, estes agentes inibem as polimerases por competirem com os verdadeiros nucleótidos, sendo frequentemente incorporados na cadeia de DNA, o que bloqueia em muitos casos o seu alongamento (Coen & Richman, 2007).

O foscarnet, por outro lado, inibe a DNA polimerase directamente, não requerendo activação enzimática (Coen & Richman, 2007). Esta molécula forma um complexo com o local de ligação do pirofosfato à DNA polimerase, impedindo a libertação do pirofosfato (Gilbert, Bestman-Smith & Boivin, 2002).

A eficácia *in vitro* é considerada máxima para a trifluridina, seguindo-se, por ordem decrescente, a idoxuridina, vidarabina, bromovinildeoxuridina e aciclovir (Gould, 2008). Maggs e Clarke (2004) relataram, em células CRFK (*Crandell Rees feline kidney*, células renais felinas de Crandell Rees) infectadas com HVF-1, uma eficácia superior da idoxuridina e do ganciclovir em relação ao cidofovir e penciclovir, que por sua vez ultrapassaram o aciclovir e o foscarnet.

A trifluridina e a idoxuridina, administradas por via tópica, têm sido largamente empregues na terapêutica da infecção ocular por HVF-1 (Plumb, 2005). A vidarabina é bem tolerada e também se utiliza de forma tópica (Maggs, 2005), tal como o aciclovir, cujo uso sistémico se encontra associado a supressão da medula óssea, com neutropénia e anemia, e o ganciclovir, que ainda não foi testado no gato (Hartley, 2010b). O famciclovir, antiviral sistémico e precursor do penciclovir, parece ser eficaz nos animais com sinais oculares e no tratamento da dermatite e rinosinusite associadas ao HVF-1, mostrando-se bem tolerado pelo organismo (Malik et al., 2009). Pelo contrário, o valaciclovir, precursor do aciclovir

(Hartley, 2010), não exerce qualquer efeito sobre a replicação do HVF-1 e pode conduzir a displasia mielóide fatal, não devendo ser utilizado (Plumb, 2005). O cidofovir diminuiu significativamente a excreção viral e a gravidade dos sinais clínicos em gatos inoculados com HVF-1, quando aplicado duas vezes por dia sob a forma de uma solução a 0,5% em ambos os olhos, durante dez dias. Não foram detectados efeitos adversos nestes animais (Fontenelle, Powell, Veir, Radecki & Lappin, 2008). Num estudo *in vitro*, o penciclovir mostrou ser um potente inibidor do vírus, com superioridade sobre o cidofovir e aciclovir (Hussein, Menashy & Field, 2008).

Actualmente, a trifluridina e a idoxuridina são considerados os antivirais de eleição no tratamento da queratite herpética felina (Maggs, 2005). Durante muitos anos, a trifluridina ocupou o lugar de maior importância; no entanto, devido à irritação e toxicidade que decorrem da sua aplicação tópica, tem vindo a ser substituída pela idoxuridina, que apresenta a vantagem adicional de ser mais económica (Plumb, 2005). Stiles (2003) recomenda para ambas a dose de uma gota quatro a seis vezes por dia, devendo o tratamento prolongar-se por duas a três semanas. A trifluridina deve ser utilizada numa concentração de 1%, enquanto a idoxuridina deve encontrar-se a 0,1%. Ambas são administradas por via tópica ocular. Infelizmente, estes fármacos não se encontram disponíveis em Portugal, onde apenas se comercializam o aciclovir (Infarmed, 2010h), o penciclovir (Infarmed, 2010d; Infarmed, 2010e), o valaciclovir (Infarmed, 2010c) e o ganciclovir (Infarmed, 2010g). Como referido anteriormente, o valaciclovir não é seguro para os gatos (Plumb, 2005) e o ganciclovir não foi ainda testado nesta espécie animal (Hartley, 2010b). Quanto ao penciclovir, apenas se encontra comercializado sob a forma de creme cutâneo e pó para solução (Infarmed, 2010d; Infarmed, 2010e) e, apesar de inibir a replicação do HVF-1 *in vitro*, são necessários estudos que comprovem a sua eficácia e segurança *in vivo* (Hussein et al., 2008).

Conclui-se assim que o aciclovir constitui, no nosso país, a opção mais indicada, encontrando-se disponível sob a forma de uma pomada oftálmica, na concentração de 30 mg/g (3%), com o nome comercial de Zovirax ® (Infarmed, 2010h), devendo ser aplicado quatro a seis vezes por dia (Hartley, 2010b). Apesar de a sua actividade contra o vírus ser, *in vitro*, mínima (Hussein et al., 2008), apresenta benefícios quando administrado por via tópica a animais com manifestações de queratite herpética, como demonstra um estudo no qual se utilizou este antiviral. Os animais apresentavam sinais oculares, tendo sido o diagnóstico de HVF-1 confirmado por imunofluorescência. Graças à aplicação de aciclovir cinco vezes por dia, registaram-se melhorias da doença ocular, obtendo-se inclusivamente a cura na maioria dos indivíduos. Tais resultados mostram que, quando a frequência de administração é elevada, o aciclovir pode ter efeitos benéficos na queratite herpética (Williams & Robinson, 2005). O seu efeito pode ainda ser melhorado se o associarmos ao IFN- α 2 humano (Gould, 2008).

3.1.2.2.1.2 Tratamento da úlcera corneana

As úlceras da córnea provocadas pelo HVF-1 requerem, para além do tratamento etiológico, medidas terapêuticas gerais que são independentes da causa da úlcera (Nelson & Couto, 2006), ou seja, administração tópica de antibiótico e, nas úlceras profundas (em que há perda de estroma), uma vez que se acompanham frequentemente de uveíte, atropina tópica a 1% para contrariar o espasmo do músculo ciliar e assim aliviar a dor (Crispin, 2008b). As anticolagenases e antiproteases tópicas são importantes em caso de queratomalácia, devendo aplicar-se com intervalos de uma a duas horas. Várias substâncias têm sido sugeridas para esta função, incluindo a acetilcisteína, o EDTA (*ethylenediaminetetraacetic acid*, ácido etilenodiaminotetracético), a heparina, tetraciclina e ainda plasma e soro (Hartley, 2010b). Se a úlcera evoluir para um descemetocélio – que representa uma emergência ocular –, deve intervir-se cirurgicamente, a fim de se realizar um enxerto conjuntival ou de submucosa intestinal porcina, ou mesmo uma queratoplastia lamelar. A ocorrência de perfuração também implica a criação de um suporte para a córnea, podendo utilizar-se uma das técnicas propostas para o descemetocélio (Crispin, 2008b) ou inclusivamente uma transposição corneoescleral lamelar (Parshall, 1973 citado por Crispin, 2008b).

Por vezes surgem úlceras superficiais crónicas cujas margens são constituídas por epitélio não aderido ao estroma. Aconselha-se então o desbridamento da úlcera, que deve ser realizado com a ajuda de um cotonete, após a aplicação de um anestésico tópico. Promove-se assim a correcta adesão do epitélio ao estroma e, adicionalmente, faz-se a remoção das células infectadas pelo vírus (Stiles, 2003).

3.1.2.2.1.3 Terapêutica adjuvante

O papel do IFN- ω felino e do IFN- α humano tem sido estudado. Ambos podem ser administrados por via tópica ou oral (Hartley, 2010b), pensando-se que na via oral, uma vez que o aparelho gastrointestinal destrói estas moléculas, a absorção ocorre através das membranas mucosas da orofaringe (Eid et al., 1999 citado por Hartley, 2010b). Os interferões são membros de uma família de citocinas que medeia a imunidade não específica, apresentando funções antivirais, antiproliferativas e imunorreguladoras (Hartley, 2010b). Mostram-se activos contra uma grande variedade de vírus DNA e RNA, podendo inclusivamente ser utilizados em espécies animais diferentes daquela de onde provêm. Quanto maior a proximidade entre as espécies, maior será a eficácia do IFN e a facilidade com que é tolerado pelo organismo do animal (Stiles, 2003).

Investigações *in vitro* com células CRFK infectadas pelo HVF-1 assinalaram uma redução significativa no tamanho das placas quando se realizou pré-incubação com IFN- ω felino ou IFN- α humano (Siebeck et al., 2006). Estas placas consistem em aglomerados circulares de células infectadas, que se formam em torno de inóculos virais colocados em culturas

celulares. Constituem, assim, um método de quantificação do vírus (Murphy, Gibbs, Horzinek & Studdert, 1999). A diminuição no número de placas apenas se verificou na presença do IFN- ω , e somente com concentrações de 100.000 U/ml e 500.000 U/ml. Os autores concluíram que o IFN- ω felino é provavelmente o mais apropriado, devendo utilizar-se em doses elevadas (500.000 U/ml), no início da doença e em conjunto com outras terapêuticas, porque a sua aplicação isolada não parece ser muito eficaz (Siebeck et al., 2006). Também Sandmeyer, Keller & Bienzle (2005) realizaram um estudo neste âmbito, tendo utilizado culturas primárias de células epiteliais corneanas felinas para avaliar os efeitos citotóxicos do IFN- α humano e a sua capacidade de inibir o HVF-1. Não se registaram efeitos adversos nas células epiteliais com as concentrações empregues, que variaram entre 10^2 e 10^6 UI/ml, e o IFN- α reduziu significativamente, numa concentração de 10^5 UI/ml, as alterações citopáticas e o título do vírus, o que encoraja a elaboração de estudos clínicos controlados para observar a resposta *in vivo* (Sandmeyer et al., 2005). Um outro trabalho relata que ocorreu expressão da proteína Mx (um marcador da resposta biológica ao IFN- ω) em leucócitos circulantes, mas não em células conjuntivais, após a administração oral de IFN- ω felino em gatos. A administração tópica do mesmo interferão em doses inferiores a 10.000 U não levou à expressão da proteína Mx, o que sugere ser esta a dose mínima. Concluiu-se assim que a resposta ao IFN- ω depende da dose e da via de administração (Bracklein, Theise, Metzler, Spiess & Richter, 2006). Pensa-se que um tratamento precoce, iniciado antes da exposição ao vírus, maximiza os efeitos do IFN (Nasisse, 2000); contudo, em gatos pré-tratados com IFN- ω felino não se verificou um efeito protector relativamente à infecção primária pelo HVF-1 (Haid et al., 2007).

A dose indicada para o IFN- ω felino é, para a via oral, de 50.000 a 100.000 U por dia (Thiry et al., 2009). Na administração tópica, recomenda-se diluir 10 MU em 19 ml de NaCl a 0,9% e aplicar então duas gotas em cada olho, cinco vezes por dia, durante dez dias (Jongh, 2004 citado por Thiry et al., 2009). Thiry e colegas (2009) sugerem ainda a utilização da via subcutânea com 1 MU/kg a cada vinte e quatro ou quarenta e oito horas.

Quanto ao IFN- α humano, pode ser administrado por via oral, na dose de 30 a 100 UI, a cada vinte e quatro horas, até à resolução dos sinais clínicos. Para os casos crónicos pode adoptar-se um tratamento a longo prazo, no qual o animal recebe a referida dose durante sete dias, a que se seguem sete dias de descanso, repetindo-se este ciclo indefinidamente. Também é possível adoptar um esquema de administração em dias alternados. Na terapêutica tópica, e utilizando uma concentração de 100 a 1000 U/ml, pode empregar-se a posologia de uma gota quatro a seis vezes por dia, durante duas a três semanas (Stiles, 2003).

Advoga-se ainda, pelo seu efeito inibidor do HVF-1 (Stiles, 2003), a suplementação oral com lisina (Crispin, 2008b), cuja dose foi já referida no âmbito da conjuntivite herpética.

A utilização tópica de corticoesteróides pode reduzir a formação de cicatrizes na córnea em casos de queratite estromal. É muito importante que estes medicamentos apenas sejam aplicados durante a fase crónica e sempre em associação com agentes antivirais, uma vez que, isoladamente, podem exacerbar as manifestações clínicas (Crispin, 2008b) e inclusivamente predispor os animais ao desenvolvimento de sequestro da córnea (Stiles, 2006). Slatter (2001) afirma mesmo que os anti-inflamatórios esteróides se encontram contra indicados, podendo levar a uma infecção herpética estromal de grande cronicidade. Nasisse (2000) mostra preferência pela ciclosporina, aplicada topicamente em conjunto com a idoxuridina, reservando a dexametasona para situações particularmente graves. Stiles (2003) considera mais prudente escolher a ciclosporina ou um anti-inflamatório não esteróide e combiná-lo com um agente antiviral. A administração de corticosteróides deve assim ser feita com grande selectividade e precaução (Andrew, 2001).

A utilização tópica da vacina intranasal (aplicando-se uma gota em cada olho) está a ser estudada (Crispin, 2005), não se recomendando, contudo, em casos de queratite estromal, uma vez que pode exacerbar a resposta imunológica responsável pelo desenvolvimento desta entidade clínica (Nasisse, 2000).

3.1.2.3 Simbléfaro

A ulceração simultânea das superfícies conjuntival e corneana expõe a substância própria da conjuntiva e o estroma da córnea, permitindo que se criem adesões entre estes tecidos. Surge assim um simbléfaro (Maggs, 2005), típico dos gatinhos, que, se não for tratado, pode converter-se numa situação permanente (e portanto mais difícil de resolver). Para além do tratamento da conjuntivite e da queratite, que, por estarmos na presença de um simbléfaro, deve incluir agentes antivirais, é importante realizar o desbridamento das adesões com bastante frequência. Este procedimento executa-se sob anestesia tópica, com a ajuda de um cotonete (Stiles, 2003).

Nos indivíduos em que o simbléfaro se torna permanente, a cirurgia é o método indicado para a sua reversão. No entanto, ela não é indicada em todas as situações. A infecção neonatal pelo HVF-1, normalmente de carácter grave, causa muitas vezes a destruição das células estaminais do limbo. Surgem assim alterações na superfície ocular e processos de cicatrização aberrante, não resolvidas eficazmente por cirurgia. Deste modo, o tratamento cirúrgico é recomendado apenas quando o simbléfaro leva a dificuldades na visão ou ao aparecimento de problemas como a queratopatia de exposição ou a falta de mobilidade palpebral. É importante que, qualquer que seja a técnica utilizada, as superfícies ulceradas não se mantenham em contacto após a cirurgia, sob pena de as adesões se voltarem a criar, amiúde de forma mais extensa do que anteriormente à intervenção (Crispin, 2008a).

3.1.2.4 Queratoconjuntivite seca

A razão pela qual esta alteração surge é ainda incerta, tendo sido sugeridas como causas a oclusão do ducto devido à tumefacção dos tecidos e a adenite lacrimal. A maioria dos gatos desenvolve queratoconjuntivite seca transitória, voltando a produção lacrimal aos valores normais com a resolução da doença herpética activa. Uma pequena percentagem apresenta uma redução permanente na produção de lágrima (Stiles, 2003).

Os sinais clínicos podem incluir hiperémia conjuntival, córnea com aparência ressequida, hiperplasia epitelial corneana (Andrew, 2001), blefaroconjuntivite (Crispin, 2008c) e queratohelcose. O diagnóstico baseia-se nos sinais clínicos e no valor do teste de Schirmer (Andrew, 2001).

O tratamento consiste na aplicação de substitutos das lágrimas (Crispin, 2005). Ocasionalmente, quando a terapêutica médica não é bem sucedida ou se mostra impraticável (Crispin, 2008c), é necessário realizar uma transposição do ducto da parótida para o tratamento a longo prazo (Crispin, 2005).

3.1.2.5 Outras

O sequestro da córnea (fig. 10) representa uma área de necrose corneana (Volopich et al., 2005), desconhecendo-se a sua causa exacta. A aparência da lesão varia, podendo ir desde uma mancha de cor castanha pouco definida até uma placa negra bem demarcada que sobressai do epitélio (Crispin, 2005). Uma zona de edema ou mesmo de ulceração pode rodear o sequestro, e há normalmente neovascularização (Crispin, 2008b). Algumas raças, como o Persa, o Siamês e o Sagrado da Birmânia, mostram predisposição para desenvolver este problema. Existe ainda uma tendência, em todas as raças, para o aparecimento de sequestro após a ocorrência de lesão corneana, que pode ter várias causas, como trauma e infecção por herpesvírus (Crispin, 2005). Vários estudos foram elaborados no sentido de esclarecer o papel que o HVF-1 desempenha, tendo Nasisse e colegas (1998) detectado, por PCR, uma prevalência de infecção de 55,1% em gatos com sequestro. Num estudo mais recente, essa prevalência mostrou-se ligeiramente inferior (44%) (Cullen, Wadowska, Singh & Melekhovets, 2005). Em ambos os casos, foi constatada a presença de uma relação entre o agente e a alteração corneana. Nasisse e colegas (1998) defendem, contudo, que o herpesvírus representa apenas uma das potenciais causas de lesão corneana que podem levar à formação de um sequestro. Adicionalmente, Volopich e colegas (2005) compararam a detecção do vírus em animais com e sem sequestro, não tendo encontrado uma associação significativa. O tratamento cirúrgico é geralmente recomendado (Crispin, 2008b), realizando-se queratectomia, com criação de um enxerto conjuntival para cobrir o defeito (Crispin, 2005). Após a intervenção, é normalmente instituída a aplicação tópica de antibiótico durante cinco dias, sendo a recorrência do problema rara (Crispin, 2008b).

Fig. 10 Sequestro da córnea (Original).



A queratite eosinofílica é uma queratopatia progressiva e infiltrativa (Moore, 2005), caracterizando-se pelo aparecimento de edema, neovascularização e placas esbranquiçadas na córnea, com despigmentação dos bordos palpebrais e inflamação da conjuntiva (Crispin, 2005). Pensa-se que seja causada por uma reacção de hipersensibilidade a um estímulo antigénico desconhecido (Prasse & Winston, 1996, citado por Spiess, Sapienza & Mayordomo, 2009), tendo sido associada ao HVF-1 (Nasisse et al., 1998). Este foi identificado, em gatos com queratite eosinofílica, numa percentagem significativamente superior à dos animais saudáveis (Nasisse et al., 1998). Volopich e colegas (2005) demonstraram também, nos seus trabalhos, a existência de uma relação entre a presença de eosinófilos na citologia e a detecção do vírus. Até ao momento não foi possível, contudo, determinar se este agente representa o factor causal, um oportunista ou um achado accidental no contexto da doença (Spiess et al., 2009). O tratamento consiste na administração tópica de corticosteróides (Moore, 2005), o que parece contradizer a hipótese de uma etiologia viral, dado que estas substâncias promovem a replicação do HVF-1 (Hartley, 2010a). A utilização de ciclosporina tópica também se encontra descrita (Spiess et al., 2009) e, quando não se observa resposta à terapêutica, pode ser necessário recorrer aos corticosteróides orais (Allgoewer, Schaeffer, Stockhaus & Vogtlin, 2001, citado por Hartley, 2010b). Alguns autores advogam ainda o uso de antivirais (Hartley, 2010b).

A uveíte foi sugerida, por Maggs e colegas (1999a), como outra das manifestações oculares do herpesvírus. Estes autores detectaram a presença de DNA viral no humor aquoso de uma maior percentagem de gatos com uveíte, em comparação com os que não apresentavam uveíte. É então possível que o HVF-1 tenha a capacidade de infectar os tecidos intraoculares, e que essa infecção se encontre associada a inflamação da úvea em alguns animais (Maggs et al., 1999a). O vírus, contudo, pode sofrer reactivação em períodos de *stress*, permanecendo por esclarecer se a sua presença representa uma causa ou uma consequência da uveíte (Andrew, 2001). Existe ainda a possibilidade de o agente ter contaminado o humor aquoso a partir dos tecidos oculares externos, durante a paracentese da câmara anterior. Torna-se, assim, imperativa a realização de estudos adicionais para ser

possível tirar mais conclusões sobre este tema (Maggs et al., 1999a). Num caso de uveíte herpética, para além da terapêutica não específica, que inclui anti-inflamatórios não esteróides ou corticosteróides e midriáticos tópicos, é de considerar a administração de antivirais tópicos e de lisina por via oral (Chang & Carter, 2010).

3.2 Calicivírus felino (CVF)

3.2.1 Introdução

3.2.1.1 Caracterização do agente

O CVF pertence à família *Caliciviridae*, género *Vesivirus* (Ramsey, 2000). Trata-se de um vírus altamente contagioso (Radford et al., 2009), de pequenas dimensões, sem invólucro, cujo genoma é constituído por uma cadeia simples de RNA (Ramsey, 2000). O virião pode manter a sua infecciosidade por períodos superiores a sete dias em condições de elevada humidade relativa (Gaskell et al., 2006). É inactivado pelo hipoclorito de sódio a 0,15%, pelo peroximonossulfato de potássio e pelo dióxido de cloro (Radford et al., 2009).

Como muitos vírus RNA, o CVF apresenta uma elevada variabilidade genética (Ramsey, 2000). Esta deve-se à facilidade com que ocorrem erros no processo de replicação (Barr & Fearn, 2010), e representa uma vantagem para o agente, conferindo-lhe uma grande adaptabilidade (Radford, Coyne, Dawson, Porter & Gaskell, 2007). Existem assim várias estirpes, que variam na antigenicidade e patogenicidade – no entanto, pensa-se que pertencem todas a um mesmo serótipo (Gaskell et al., 2006).

3.2.1.2 Epidemiologia

O CVF encontra-se distribuído por todo o mundo (Ramsey, 2000), apresentando uma prevalência proporcional ao número de gatos, ou seja, com valores máximos em grandes grupos de animais mantidos em proximidade (Radford et al., 2007). Pensa-se que apenas infecta os membros da família *Felidae* (Ramsey & Tennant, 2001), sendo o gato doméstico o mais frequentemente afectado (Ramsey, 2000). Estudos recentes confirmam que várias espécies de felídeos selvagens estiveram expostas a este agente (Driciru et al., 2006; Filoni et al., 2006; Munson et al., 2004). Foi ainda comprovado, através de rastreios serológicos efectuados na espécie canina e de estudos realizados em cachorros com diarreia, que existe uma circulação interespecífica do vírus entre cães e gatos. Desconhece-se, contudo, se ele é patogénico para o cão e se a sua circulação nesta espécie desempenha um papel de relevo na epidemiologia da doença felina (Di Martino, Di Rocco, Ceci & Marsilio, 2009; Martella et al., 2002).

A excreção viral, que ocorre nos animais com infecção aguda e nos portadores (Radford et al., 2007), dá-se através das secreções orais, nasais e oculares, sendo o contacto directo a

principal via de transmissão (Gaskell et al., 2006). O agente pode também ser encontrado no sangue, fezes e urina dos animais infectados (Hurley & Sykes, 2003). A transmissão indirecta é possível, principalmente em ambientes confinados, com muitos animais, onde as secreções infectantes contaminam os tratadores e os utensílios de trabalho (Radford et al., 2007).

A morbilidade tem valores elevados, embora a mortalidade seja reduzida (Pesavento, Chang & Parker, 2008). Uma imunidade pré-existente, adquirida por via materna ou por vacinação, não impede que os animais sejam infectados ou se tornem portadores, podendo, no entanto, reduzir ou eliminar os sinais clínicos (Radford et al., 2007). Nos animais que já contactaram com o vírus, a proximidade entre as estirpes permite por via de regra que se desenvolva algum grau de protecção cruzada; todavia, muitos gatos sofrem infecção sequencial por diferentes estirpes, apresentando sintomatologia variável (Gaskell et al., 2006). Uma pequena percentagem dos indivíduos parece mostrar resistência à infecção, o que pode estar relacionado com mecanismos imunomediados ou com polimorfismo dos receptores celulares do hospedeiro (Coyne et al., 2006).

3.2.1.3 Patogenia

Tal como para o HVF-1, as vias naturais de infecção para o calicivírus felino são a nasal, a oral e a conjuntival. A replicação ocorre predominantemente nos tecidos orais e respiratórios (Gaskell et al., 2006), com destaque para a orofaringe, e conduz à necrose das células epiteliais (Radford et al., 2009) e ao desenvolvimento de rinite (Hurley & Sykes, 2003). Na cavidade oral, surgem vesículas, que posteriormente rupturam, originando úlceras (Gaskell et al., 2006).

Como se referiu anteriormente, o CVF mostra grande plasticidade genética (Ramsey, 2000), a qual se traduz numa grande variedade de estirpes, que diferem em relação ao tropismo e à virulência (Gaskell et al., 2006). Assim, ocasionalmente, o vírus atinge o aparelho respiratório inferior, causando lesões pulmonares. Estas consistem, inicialmente, numa alveolite focal, que leva ao aparecimento de áreas de pneumonia exsudativa aguda e, posteriormente, ao desenvolvimento de uma pneumonia intersticial proliferativa (Radford et al., 2007). Noutros casos, o CVF afecta predominantemente as articulações, surgindo sinovites agudas, com espessamento da membrana sinovial e aumento do volume de líquido sinovial (Gaskell et al., 2006). Quanto à conjuntivite, existem dúvidas de que o vírus tenha capacidade para a desencadear (Ramsey, 2000), sugerindo-se que o seu aparecimento se deva a co-infecção por outros agentes (Crispin, 2008a).

Nos últimos doze anos, têm sido registados esporadicamente surtos de doença sistémica grave, designada doença virulenta sistémica, com elevada mortalidade (Coyne et al., 2006; Pedersen, Elliott, Glasgow, Poland & Keel, 2000; Reynolds et al., 2009; Schorr-Evans, Poland, Johnson & Pedersen, 2003). Nestas circunstâncias, o vírus apresenta um tropismo

mais extenso, causando ulceração da cavidade oral e por vezes da pele, edema na zona da cabeça, pavilhão auricular e membros (Pesavento et al., 2008), pneumonia, hepatomegália, pancreatite e pericardite (Gaskell et al., 2006).

Tal como acontece na infecção herpética, desenvolve-se um estado de portador. Este apresenta, no entanto, várias diferenças em relação ao que foi descrito para o HVF-1. O vírus persiste nas tonsilas e noutros tecidos orofaríngeos, sendo excretado continuamente. Assim, os portadores de calicivírus são sempre contagiosos para os outros gatos. Na maioria dos casos, contudo, o CVF não persiste no organismo para o resto da vida do animal. Grande percentagem dos animais continua a excretá-lo 30 dias após a infecção, mantendo-se a excreção em cerca de 50% dos animais aos 75 dias. Ao longo do tempo, esta proporção continua a diminuir, constituindo os portadores a longo prazo uma minoria (Gaskell et al., 2006). Um estudo de Coyne, Gaskell, Dawson, Porter e Radford (2007) sugere que apenas uma pequena percentagem dos indivíduos apresenta verdadeira infecção persistente, e que nesses animais ocorre evolução progressiva do vírus, a qual, segundo Radford e colegas (1998), se deve à pressão de selecção efectuada pelo sistema imunitário.

3.2.1.4 Quadro clínico

A maioria das estirpes induz um quadro clínico ligeiro, ocorrendo inicialmente febre e depressão, às quais se segue a ulceração da cavidade oral, que é mais frequente na língua, podendo, no entanto, ocorrer em qualquer região da boca. É comum o aparecimento de espirros, conjuntivite e corrimento nasal e ocular, embora de forma menos marcada do que na infecção por herpesvírus (Gaskell et al., 2006). Alguns animais desenvolvem doença crónica (Foley, 2006).

Uma pequena percentagem das estirpes causa pneumonia, com consequente dispneia, e outras caracterizam-se pelo envolvimento articular (Gaskell et al., 2006), observando-se claudicação (Radford et al., 2009). Esta pode surgir no início da infecção, desconhecendo-se qual a patogénese envolvida, ou algumas semanas depois – neste caso, possivelmente devido à deposição de complexos imunes nas articulações (Foley, 2006). Há ainda estirpes não patogénicas (Gaskell et al., 2006).

As estirpes de maior virulência podem causar doença sistémica grave (Gaskell et al., 2006), designada doença virulenta sistémica. Os animais apresentam sinais típicos de infecção por calicivírus, como anorexia, febre, ulceração oral e corrimento nasal e ocular (Hurley & Sykes, 2003). Pode verificar-se também edema facial e dos membros (Gaskell et al., 2006), dermatite ulcerativa (Radford et al., 2007), icterícia, dispneia grave, vômito, diarreia, e, numa fase mais avançada, sinais de coagulopatia. A morte representa o desfecho final em aproximadamente 50% dos casos (Hurley & Sykes, 2003).

Pensa-se que o complexo gengivite-estomatite linfoplasmocítica, uma doença crónica caracterizada pela ocorrência de gengivite, por vezes com faucite e glossite concomitantes (Foley, 2006), possa também estar relacionado com a infecção pelo calicivírus felino (Addie, Radford, Yam & Taylor, 2003; Radford et al., 2007). Esta entidade clínica parece resultar de uma reacção imunomediada ao CVF (Radford et al., 2009), com provável envolvimento de factores adicionais, como outros agentes patogénicos e particularidades do hospedeiro (Gaskell et al., 2006). Até ao momento, não foi possível reproduzir a doença experimentalmente (Radford et al., 2009). Tem sido ainda sugerida uma relação com a doença do tracto urinário distal felino (Rice et al., 2002), não havendo, contudo, estudos que demonstrem uma associação clara entre esta entidade clínica e o vírus (Radford et al., 2007).

Em gatos com infecções crónicas de título elevado, em locais de grande densidade animal e com condições sanitárias deficientes, pode desenvolver-se glomerulonefrite por deposição de complexos imunes, surgindo insuficiência renal acompanhada de proteinúria acentuada, embora esta situação seja rara (Foley, 2006).

3.2.1.5 Métodos complementares de diagnóstico

3.2.1.5.1 Métodos de detecção viral

Os resultados destes testes de diagnóstico devem ser sempre interpretados em conjunto com o quadro clínico, uma vez que a excreção do CVF pode ocorrer em animais assintomáticos. O mesmo se aplica às estirpes relacionadas com a doença virulenta sistémica, dado que não foi possível até ao momento identificar marcadores moleculares consistentes que as diferenciem das outras estirpes. Deste modo, para reconhecer um surto de doença virulenta sistémica é necessário observar um quadro clínico compatível e realizar o isolamento e sequenciação de uma estirpe de CVF molecularmente distinta a partir de pelo menos dois indivíduos afectados (Hurley & Sykes, 2003).

O isolamento viral constitui o método mais fiável para a detecção do CVF (Hurley & Sykes, 2003). Os custos consideráveis, que implica, e a necessidade de um meio de transporte viral levam, no entanto, a que não seja empregue com frequência (Ramsey, 2000). Trata-se de uma técnica que detecta a presença de viriões infecciosos (Radford et al., 2009), podendo realizar-se a partir de esfregaços nasais, conjuntivais, orofaríngeos (Hurley & Sykes, 2003) ou de qualquer órgão que se encontre potencialmente infectado, incluindo o pulmão, o baço, o fígado e outros órgãos internos. O material biológico deve ser colocado em meio de transporte viral (Foley, 2006), mantendo-se sob refrigeração até à chegada ao laboratório (Hurley & Sykes, 2003), onde é processado de imediato ou submetido a congelação e armazenamento para posterior isolamento (Foley, 2006). O CVF é normalmente isolado em células CRFK, avaliando-se a presença de efeito citopático, caracterizado pelo

destacamento da monocamada celular e pelo aparecimento de agregados celulares semelhantes a cachos de uvas, após 12 a 52 horas (Foley, 2006).

Outro dos métodos disponíveis é a imunofluorescência, que permite identificar o agente em material de raspagem da conjuntiva, esfregaços faríngeos ou tonsilares ou ainda esfregaços por impressão das amostras de biopsia das tonsilas (Nelson & Couto, 2006). Foley (2006) refere ainda a possibilidade de detecção do vírus por imunohistoquímica, em cortes de tecidos fixados com formalina.

Devido à grande variedade de estirpes apresentada pelo CVF e à rápida degradação enzimática sofrida pelo seu RNA genómico, o PCR apresenta menor fiabilidade para este vírus do que para os vírus DNA (Hurley & Sykes, 2003). Mostra, contudo, utilidade na investigação de surtos e no âmbito da epidemiologia molecular (Radford et al., 2009). O RNA é submetido, em primeiro lugar, a uma transcrição reversa, produzindo-se cDNA (*complementary DNA*, DNA complementar), sobre o qual se realiza então a técnica de amplificação. Mercê deste passo preliminar, o método recebe a designação de RT-PCR (Foley, 2006). Dependendo do quadro clínico e do desfecho da infecção, podem utilizar-se esfregaços orais ou conjuntivais, sangue, raspagens cutâneas e tecido pulmonar (Radford et al., 2009).

3.2.1.5.2 Serologia

A detecção de anticorpos contra o calicivírus felino pode ser feita por neutralização viral ou por ELISA (*enzyme linked immuno sorbent assay*, ensaio imunoenzimático). A seroprevalência, devido às altas taxas de infecção natural e à frequência com que se realiza a vacinação, é normalmente elevada, pelo que a serologia não apresenta interesse no diagnóstico (Ramsey & Tennant, 2001). A medição do título de anticorpos pode, todavia, dar uma indicação aproximada da protecção imunológica que cada indivíduo possui (Lappin, Andrews, Simpson & Jensen, 2002).

3.2.1.6 Tratamento

Os antivirais disponíveis actualmente não têm utilidade no tratamento da infecção pelo CVF (Ramsey, 2000). A ribavirina mostrou eficácia contra o vírus *in vitro*; porém, a sua elevada toxicidade na espécie felina impede que seja utilizada (Gaskell & Dawson, 2005). Alguns clínicos recorrem ao IFN (Radford et al., 2007), tendo sido realizados estudos *in vitro* que comprovam a eficácia do IFN α felino contra o CVF (Baldwin et al., 2004; Taira et al., 2005). Esta eficácia não foi, contudo, testada *in vivo* (Radford et al., 2009).

O tratamento do complexo gengivite-estomatite linfoplasmocítica representa um desafio considerável, sendo alguns casos considerados refractários a toda e qualquer terapêutica. Várias abordagens têm sido sugeridas, incluindo a instituição de antibioterapia de largo espectro, com particular eficácia contra bactérias anaeróbias, a utilização de soluções de

higiene oral, a administração de corticosteróides e a extracção dentária. Na poliartrite imunomediada estão indicados os corticosteróides em doses imunossupressoras, podendo adicionar-se a azatioprina se não houver resposta (Foley, 2006).

Os gatos com doença virulenta sistémica devem receber uma fluidoterapia agressiva, na qual é importante incluir colóides. Nos surtos descritos, têm sido tentadas diversas estratégias, nomeadamente a administração de antibióticos de largo espectro, de glucocorticóides e de IFN- α (Hurley & Sykes, 2003).

3.2.1.7 Profilaxia

3.2.1.7.1 Profilaxia médica

A vacinação contra o CVF foi já descrita em conjunto com o HVF-1. É de realçar que, tal como para o herpesvírus, esta vacinação apenas reduz ou elimina os sinais clínicos, não impedindo que ocorra infecção e desenvolvimento do estado de portador (Radford et al., 2007). Devido à considerável variedade antigénica, que caracteriza este agente, nenhuma estirpe induz uma protecção igualmente eficaz contra todos os isolados. Algumas, contudo, mostram-se mais imunogénicas e apresentam uma maior reacção cruzada com as restantes, sendo largamente utilizadas na elaboração de vacinas – é o caso das estripes F9 e 255 (Gaskell et al., 2006).

3.2.1.7.2 Profilaxia sanitária

As medidas indicadas para o controlo da coriza são apropriadas em todos os casos de infecção por calicivírus felino, excepto nos surtos de doença virulenta sistémica. Nestas situações, que ocorrem normalmente em clínicas veterinárias, os animais suspeitos devem ser submetidos a um isolamento rigoroso, providenciando-se equipamento protector às pessoas encarregadas de os tratar, que devem ser em número reduzido. Os animais expostos também têm que ser isolados e, juntamente com os indivíduos infectados, devem ser monitorizados em relação à excreção viral, antes de contactarem com gatos não expostos. A desinfecção das instalações é essencial, sendo o hipoclorito de sódio a 0,15% o composto mais adequado. As pessoas devem lavar as mãos e mudar de vestuário e calçado após deixar o local afectado. Algumas clínicas deparam-se mesmo com a necessidade de impedir a entrada de gatos durante algumas semanas (Hurley & Sykes, 2003).

3.2.2 Manifestações oculares

O quadro clínico típico caracteriza-se, entre outros sinais, pelo desenvolvimento de conjuntivite e presença de corrimento ocular, embora de forma mais ligeira do que na infecção pelo herpesvírus felino (Gaskell et al., 2006). Pensa-se, contudo, que esta sintomatologia ocular esteja associada à co-infecção por outros agentes (Crispin, 2008a),

questionando-se a responsabilidade do calicivírus felino no aparecimento de conjuntivite (Ramsey, 2000).

Uma vez que o calicivírus não se mostra sensível aos antivirais disponíveis actualmente, o tratamento é predominantemente sintomático (Crispin, 2008a), envolvendo os cuidados de suporte descritos para a coriza em geral, nomeadamente a remoção dos exsudados que se acumulam em redor dos olhos (Crispin, 2005). Se a conjuntivite se complicar por co-infecção bacteriana (Crispin, 2008a), que é evidenciada pela presença de corrimento mucopurulento (Ramsey, 2000), recomenda-se a administração tópica de um antibiótico de largo espectro de seis em seis horas, devendo esta terapêutica continuar-se durante alguns dias após a resolução da sintomatologia ocular (Ramsey, 2000).

3.3 *Bordetella bronchiseptica*

3.3.1 Introdução

3.3.1.1 Caracterização do agente

A *B. bronchiseptica* é um cocobacilo aeróbio (Gaskell et al., 2006), Gram negativo e flagelado que coloniza o tracto respiratório de vários mamíferos (Egberink et al., 2009). Pertence à família *Alcaligenaceae* (Prescott, Harley & Klein, 2005), apresentando uma relação próxima com as bactérias *Bordetella pertussis* e *Bordetella parapertussis*, que causam a tosse convulsa no Homem. A sua estabilidade físico-química não se encontra determinada; no entanto, pensa-se que seja semelhante à da *B. pertussis* (Egberink et al., 2009), que resiste durante mais de dez dias no ambiente (Walther & Ewald, 2004, citado por Egberink et al., 2009). Mostra-se susceptível aos desinfectantes comuns (Egberink et al., 2009).

3.3.1.2 Epidemiologia

Estudos serológicos demonstraram que a *B. bronchiseptica* apresenta uma ampla distribuição na população felina (Gaskell et al., 2006), tendo sido detectada por PCR em gatos provenientes de estabelecimentos com e sem presença de coriza, numa percentagem de 5% e 1,3 %, respectivamente. A seroprevalência correspondente foi de 61% e 41% (Helps et al., 2005). Esta bactéria é um importante agente patogénico do tracto respiratório nos cães, suínos e roedores (Gaskell et al., 2006), podendo ainda infectar coelhos (Egberink et al., 2009). Actualmente, embora em alguns casos desempenhe apenas um papel secundário (Rand, 2006), é considerada uma causa primária de coriza felina (Gaskell et al., 2006). Vários factores, contudo, parecem contribuir para a sua patogenicidade, determinando se leva ou não ao aparecimento de doença. Esses factores incluem a presença prévia de infecções virais e várias condicionantes ambientais causadoras de

stress (Egberink et al., 2009). A bordetelose felina constitui assim um problema típico dos abrigos para animais e dos gatis, surgindo poucos casos individuais (Gaskell et al., 2004).

A excreção dá-se através das secreções nasais e orais (Gaskell et al., 2004), pensando-se que ocorra transmissão por via directa e indirecta (Egberink et al., 2009). O agente mostra uma elevada contagiosidade, espalhando-se rapidamente pelos gatos que se encontrem no mesmo meio que o indivíduo afectado (Tilley & Smith, 2000). Nos gatinhos que vivem em ambientes contaminados, a seroconversão ocorre entre as sete e as dez semanas de idade (Hoskins, 1999).

Parece haver transmissão entre cães e gatos (Dawson et al., 2000; Foley, Rand, Bannasch, Norris & Milan, 2002), o que é importante no controlo da doença, especialmente em instalações onde as duas espécies co-habitam (Gaskell et al., 2006). O Homem pode ser infectado, principalmente em situações de imunodeficiência, sendo contudo a transmissão zoonótica pouco frequente (Egberink et al., 2009).

3.3.1.3 Patogenia

Este microorganismo coloniza o epitélio ciliado do tracto respiratório (Egberink et al., 2009). Geralmente, no gato, apenas o tracto respiratório superior é afectado. Contudo, existem casos de envolvimento do tracto respiratório inferior, com aparecimento de broncopneumonia. Embora a *B. bronchiseptica* seja considerada um agente patogénico primário, existem outros factores, nomeadamente agentes infecciosos como os vírus respiratórios e situações desencadeadoras de *stress* como o desmame, o sobrepovoamento e a higiene e ventilação deficientes, que desempenham um papel importante na patogenia. Estes factores constituem uma possível explicação para o desenvolvimento de manifestações mais graves, como a broncopneumonia, em alguns indivíduos (Gaskell et al., 2006).

A porta de entrada parece ser a cavidade oronasal (Gaskell et al., 2006) e o período de incubação dura aproximadamente cinco dias (Tilley & Smith, 2000). Vários factores de virulência (Gaskell et al., 2006), entre os quais algumas adesinas, como a hemaglutinina filamentosa, as fímbrias e a periactina (Egberink et al., 2009), contribuem para a adesão aos cílios do tracto respiratório (Gaskell et al., 2006). A presença de motilidade, conferida pelos flagelos, facilita também a colonização. Uma vez estabelecida, a bactéria liberta toxinas e proteínas específicas que induzem ciliostase e destruição dos cílios (Egberink et al., 2009), com consequente insuficiência do mecanismo de depuração mucociliar, o que facilita a persistência bacteriana e a colonização por mais bactérias. Estas toxinas causam ainda alterações inflamatórias locais e sistémicas (Gaskell et al., 2006).

A *B. bronchiseptica* permanece no organismo dos animais durante vários meses, podendo estes ser ou não infecciosos (Ramsey & Tennant, 2001). Alguns autores defendem que se desenvolve, em determinados indivíduos, um estado de portador (Gaskell et al., 2006),

tendo sido detectada excreção deste agente em 9% dos gatos saudáveis, num estudo realizado por Binns e colegas (1999).

3.3.1.4 Quadro clínico

A *B. bronchiseptica* causa por norma sinais clínicos ligeiros, relacionados com o tracto respiratório superior, como espirros, corrimento nasal (Ramsey & Tennant, 2001), febre, linfadenopatia mandibular (Tilley & Smith, 2000) e, por vezes, tosse (Ramsey & Tennant, 2001), a qual é menos marcada do que na espécie canina (Gaskell et al., 2006). O quadro clínico é geralmente auto-limitante, ocorrendo resolução espontânea após 10 a 14 dias (Hoskins, 1999). Os indivíduos podem, contudo, manter-se assintomáticos ou, pelo contrário, apresentar sintomatologia grave, decorrente do desenvolvimento de uma pneumonia (Tilley & Smith, 2000), que pode culminar na morte do animal, particularmente se este for muito jovem (Rand, 2006). A forma grave da doença é mais frequente nos gatinhos com idade inferior a seis semanas, e caracteriza-se pelo aparecimento de febre, letargia, anorexia, tosse produtiva, corrimento nasal, dispneia (Tilley & Smith, 2000) e cianose (Rand, 2006). A auscultação pulmonar pode revelar-se normal ou evidenciar a presença de aumento do murmúrio vesicular, ferveores ou sibilos (Tilley & Smith, 2000).

3.3.1.5 Métodos complementares de diagnóstico

A cultura bacteriana apresenta uma baixa sensibilidade (Egberink et al., 2009), sendo particularmente difícil detectar a bactéria nos portadores crónicos, uma vez que estes a libertam em quantidades diminutas (Tilley & Smith, 2000). As amostras para cultura podem obter-se por esfregaço da orofaringe (Egberink et al., 2009) ou da cavidade nasal (Gaskell et al., 2006), por aspiração transtraqueal ou através de lavagem broncoalveolar, sendo colocadas em meio de transporte de Amies com ou sem carvão. Após sementeira, preferencialmente num meio selectivo, como o agar com carvão e cefalexina, que inibe o crescimento da restante microbiota respiratória (Egberink et al., 2009), são incubadas, a uma temperatura entre 35°C e 37°C. Após 48 horas, é possível visualizar as colónias, de pequena dimensão e com coloração cinzento-pérola brilhante (Speakman et al., 1999).

A identificação de *B. bronchiseptica* em amostras provenientes de lavagem bronco-alveolar, em gatos com sinais de infecção respiratória inferior, determina um diagnóstico etiológico positivo. O isolamento deste agente a partir de esfregaços orofaríngeos em animais cuja sintomatologia se reporta ao tracto respiratório superior tem uma interpretação menos clara, embora indique por regra a necessidade de instituição de antibioterapia (Egberink et al., 2009). A cultura permite, aliás, testar a sensibilidade da bactéria aos antibióticos, orientando a terapêutica (Tilley & Smith, 2000). Em indivíduos provenientes de locais com grande densidade animal, onde a prevalência de infecção é mais elevada, um resultado positivo

terá menor relevância, podendo representar uma simples coincidência (Egberink et al., 2009).

O PCR pode ser realizado a partir de esfregaços orofaríngeos e oculares, processando-se com maior rapidez do que a cultura bacteriana, além de implicar menos custos e menos restrições logísticas (Helps et al., 2005).

A serologia não se encontra disponível facilmente (Gaskell et al., 2006) e tem um valor limitado no diagnóstico, uma vez que a seroprevalência na população é, em geral, elevada (Egberink et al., 2009).

3.3.1.6 Tratamento

É recomendada, inclusivamente em caso de doença ligeira, a instituição de antibioterapia (Egberink et al., 2009) por via oral, durante 10 a 14 dias (Tilley & Smith, 2000), dado que a bactéria pode progredir e infectar o tracto respiratório inferior (Egberink et al., 2009). Se houver pneumonia, esta terapêutica deverá continuar-se durante pelo menos dez dias após a resolução dos sinais radiográficos (Tilley & Smith, 2000).

A escolha do antibiótico deverá, idealmente, basear-se nos resultados do TSA (teste de sensibilidade aos antibióticos). Se não for possível obter essa informação, as tetraciclina constituem uma boa opção empírica, tendo mostrado eficácia contra a maioria dos isolados felinos de *B. bronchiseptica*. Dentro deste grupo de antibióticos, a doxiciclina (Egberink et al., 2009), numa dose de 5 a 10 mg/kg a cada doze horas (Nelson & Couto, 2006), é o mais apropriado (Egberink et al., 2009), embora algumas fontes sugiram que pode não ter capacidade de eliminar o organismo nas fases mais avançadas da infecção. As tetraciclina encontram-se, teoricamente, contraindicadas nos gatinhos jovens e nas fêmeas gestantes, devido ao desenvolvimento dentário (Gaskell et al., 2006) e esquelético (Plumb, 2005); tais restrições, porém, parecem ser menos importantes para a doxiciclina (Gaskell et al., 2006). Pode ainda optar-se pela amoxicilina com ácido clavulânico, numa dose de 62,5 mg por gato a cada doze horas (Tilley & Smith, 2000). Na maioria dos casos, a enrofloxacin também é eficaz (Gaskell et al., 2004), recomendando-se, no gato, uma dose de 2,5 a 5 mg/kg de doze em doze horas (Plumb, 2005).

3.3.1.7 Profilaxia médica

Em alguns países europeus, encontra-se disponível uma vacina viva modificada de administração intranasal (Egberink et al., 2009), que induz protecção imunológica após três a cinco dias (Rand, 2006). Esta não faz parte do esquema geral de vacinação, uma vez que a *B. bronchiseptica* causa apenas, por norma, doença ligeira. A sua utilização deverá assim limitar-se aos animais residentes em abrigos, onde o risco de infecção é muito elevado. Em gatis de criadores, ela é recomendada nos casos onde existe história de doença causada

por este microorganismo (Egberink et al., 2009), não evitando que ocorra infecção mas reduzindo o aparecimento de sinais clínicos (Rand, 2006).

Após a primovacinação, que consiste numa única administração, realizam-se reforços anuais enquanto o animal se mantiver em situação de alto risco. É de salientar que as vacinas contra *B. bronchiseptica* contendo bactérias viáveis podem ocasionalmente levar ao aparecimento de sinais clínicos ligeiros, e não devem ser nunca dadas a gatinhos com idade inferior a quatro semanas. São também de evitar em gatos com proprietários imunocomprometidos, uma vez que provocam excreção do agente. Da mesma forma, a sua utilização em animais com imunodeficiência não é recomendada. Em indivíduos que estejam a receber antibioterapia, as vacinas mostram-se ineficazes (Egberink et al., 2009).

Em Portugal, segundo o Simposium Veterinário 2006, não se encontra disponível qualquer vacina contra a *B. Bronchiseptica* destinada à espécie felina (CESA, 2006).

3.3.2 Manifestações oculares

Não são referidas, na literatura consultada, quaisquer manifestações oculares decorrentes da infecção por esta bactéria no gato.

3.4 *Chlamydophila felis*

3.4.1 Introdução

3.4.1.1 Caracterização do agente

A *C. felis* é uma bactéria cocóide (Gruffydd-Jones et al., 2009), com uma parede celular semelhante à das bactérias Gram negativas (Sykes, 2004), não contendo, no entanto, peptidoglicano. Pertence à família *Chlamydiaceae*, ordem Chlamydiales (Gruffydd-Jones et al., 2009), e foi isolada pela primeira vez a partir de gatos com coriza em 1942 (Baker, 1942 citado por Sykes, 2004), tendo recebido inicialmente a designação de *Chlamydia psittaci* var. *felis* (Crispin, 2008a). O seu genoma foi sequenciado recentemente (Azuma et al., 2006).

Trata-se de um microorganismo intracelular obrigatório, não apresentando um sistema de citocromos para o transporte de electrões, pelo que não sintetiza adenosina trifosfato (ATP) nem guanosina trifosfato (GTP) (Sykes, 2004). Deste modo, encontra-se dependente do hospedeiro para obter energia (Prescott et al., 2005), não demonstrando a capacidade de se replicar e de subsistir de forma autónoma no meio exterior (Ramsey, 2000). Como tal, sobrevive apenas durante alguns dias à temperatura ambiente, sendo inactivado pelos solventes dos lípidos e detergentes. Apresenta, porém, alguma resistência às substâncias ácidas e básicas (Sykes, 2004).

3.4.1.2 Epidemiologia

A *C. felis* encontra-se distribuída por todo o mundo (Crispin, 2008a), embora com maior prevalência nos locais que alojam um grande número de animais, como os abrigos e os gatis de criação (Tilley & Smith, 2000). Afecta maioritariamente indivíduos com menos de 1 ano (Gruffydd-Jones et al., 2009), havendo maior risco de infecção entre os dois e os seis meses de idade (Sykes, Anderson, Studdert & Browning, 1999). Alguns casos de conjuntivite humana têm sido atribuídos a esta bactéria (Sykes, 2004), entre os quais o de um paciente imunocomprometido que adquiriu, provavelmente, a infecção a partir dos seus gatos (Hartley et al., 2001). Os dados epidemiológicos disponíveis não fazem supôr, contudo, que exista um risco zoonótico importante (Gruffydd-Jones et al., 2009).

A transmissão dá-se predominantemente de forma directa, constituindo as secreções oculares o principal veículo de excreção do agente. Desconhece-se se a transmissão venérea é possível, podendo ocorrer isolamento a partir do recto e da vagina (Gruffydd-Jones et al., 2009). Este microorganismo representa, no gato, a mais importante causa bacteriana de conjuntivite (Crispin, 2005), tendo sido detectado por PCR em 14,3% dos animais com coriza testados por Sykes e colegas (1999). A prevalência nos indivíduos assintomáticos é baixa – no mesmo estudo, apenas se identificou, em 95 gatos, um caso positivo (Sykes, 2004; Sykes et al., 1999).

3.4.1.3 Patogenia

A *C. felis* apresenta um ciclo de replicação muito característico que envolve duas entidades distintas: o corpo elementar e o corpo reticulado (Gruffydd-Jones et al., 2009). A bactéria entra na célula hospedeira por fagocitose, sob a forma de corpo elementar, impedindo a fusão do fagossoma com os lisossomas. Transforma-se então num corpo reticulado (Prescott et al., 2005), que se multiplica no interior de um vacúolo intracelular. Os vários corpos reticulados reorganizam-se, originando corpos elementares (Sykes, 2004), os quais se libertam quando ocorre lise celular, infectando novas células (Gruffydd-Jones et al., 2009).

As células epiteliais da conjuntiva constituem o alvo predilecto deste agente. Consequentemente, a conjuntivite destaca-se como a lesão mais típica (Sykes, 2004), podendo também ocorrer infecção do tracto respiratório superior, com desenvolvimento de rinite ligeira (Tilley & Smith, 2000). Raramente, a bactéria atinge o tracto respiratório inferior (Ramsey, 2000), levando ao aparecimento de lesões pulmonares (Tilley & Smith, 2000), que não apresentam, contudo, importância clínica (Sykes, 2004). A córnea não é afectada (Crispin, 2005).

Para além da conjuntiva, a *C. felis* parece infectar também o aparelho reprodutor feminino, não sendo possível, no entanto, estabelecer uma relação definitiva entre a sua presença e a ocorrência de alterações patológicas (Sykes, 2004). Pode ainda ser encontrada no aparelho

gastrointestinal (Tilley & Smith, 2000), não havendo indicações de que cause doença (Gruffydd-Jones et al., 2009).

A excreção conjuntival termina normalmente ao fim de 60 dias (Gruffydd-Jones et al., 2009), prolongando-se durante mais tempo nos casos em que se observa infecção persistente (Sykes, 2004). De facto, tal como para os outros agentes, existe a possibilidade de desenvolvimento de um estado de portador, que se prolonga por meses ou mesmo anos, durante o qual o indivíduo pode mostrar-se assintomático ou apresentar conjuntivite intermitente. Os acontecimentos causadores de *stress*, como o parto, desencadeiam a recorrência dos sinais oculares e a excreção da bactéria (Ramsey, 2000). O tracto intestinal pode albergá-la durante longos períodos, contribuindo para a sua persistência (Sykes, 2004). Nas situações em que existe co-infecção pelo FIV, a resolução da doença também é mais demorada, devido à imunodeficiência induzida por este retrovírus (Ramsey, 2000).

3.4.1.4 Quadro clínico

A *C. felis* foi o primeiro agente respiratório identificado no gato, tendo sido responsabilizada, inicialmente, pela maioria dos casos de coriza. Com o isolamento do CVF e do HVF-1 nos anos 1950, o papel desta bactéria foi questionado. Mais tarde, no final da década de 70, vários estudos permitiram esclarecer a sua importância no desenvolvimento de conjuntivite (Sykes, 2004). Esta sobrevém após um período de incubação de dois a cinco dias (Gruffydd-Jones et al., 2009) e, numa primeira fase, é frequentemente unilateral (Rand, 2006), progredindo em regra para uma forma bilateral (Gruffydd-Jones et al., 2009). É possível a ocorrência de complicações oculares, como adesões conjuntivais (Gruffydd-Jones et al., 2009); a córnea, porém, não sofre alterações (Crispin, 2005). Ocasionalmente, os animais apresentam sintomatologia do tracto respiratório superior (Sykes, 2004), mas esta é muito ligeira. De facto, se existir doença respiratória sem doença ocular concomitante, o envolvimento da *C. felis* é pouco provável. Associado ao quadro inicial de conjuntivite, podem observar-se em alguns casos febre, inapetência e perda de peso, que são transitórias (Gruffydd-Jones et al., 2009). Os indivíduos expostos desenvolvem uma protecção imunológica fraca ou de curta duração (Sykes, 2004), sendo a reinfeção comum (British Small Animal Veterinary Association [BSAVA], 2000).

A relação deste microorganismo com o aparecimento de problemas reprodutivos é ainda incerta. Pensa-se que possa causar aborto, mortalidade neonatal e infertilidade (Sykes, 2004), presumindo-se que as fêmeas com infecção vaginal transmitam a bactéria aos neonatos durante o parto (Ramsey, 2000), dado que nestes se observa, por vezes, *ophthalmia neonatorum* (Slatter, 2001). A maioria dos gatinhos, contudo, parece estar protegida por anticorpos de origem materna (Sykes, 2004).

TerWee e colegas (1998) relatam ainda o desenvolvimento de claudicação em 10 de 19 gatos infectados experimentalmente, sendo necessários mais estudos para verificar se esta manifestação clínica ocorre em animais com infecção natural.

3.4.1.5 Métodos complementares de diagnóstico

3.4.1.5.1 Métodos de detecção bacteriana

O PCR constitui, actualmente, a técnica de eleição, graças à sua sensibilidade (Gruffydd-Jones et al., 2009), rapidez e baixo custo, em comparação com os métodos tradicionais (Sykes, 2004). Permite também contornar as dificuldades relacionadas com a falta de viabilidade do organismo fora do hospedeiro (Gruffydd-Jones et al., 2009), havendo, por outro lado, uma maior probabilidade de ocorrência de falsos positivos devido a contaminação (Sykes, 2004). A detecção do DNA bacteriano faz-se normalmente a partir de esfregaços conjuntivais, embora também seja possível utilizar fetos abortados e esfregaços rectais e vaginais (Gruffydd-Jones et al., 2009). As amostras da conjuntiva podem ainda obter-se através de uma escova de citologia ou por raspagem com uma espátula de Kimura (Crispin, 2005). Tenta colher-se a maior quantidade de células possível, uma vez que a *C. felis* é intracelular (Gruffydd-Jones et al., 2009).

O isolamento e cultura representam o *Gold Standard* no diagnóstico laboratorial da clamidiose felina (Sykes, 2004). Têm lugar em culturas celulares (Ramsey, 2000), a partir de esfregaços ou raspagens conjuntivais (Crispin, 2005), previamente acondicionados num meio de transporte especial contendo antimicrobianos apropriados. A confirmação da infecção é realizada por imunofluorescência directa, com utilização de anticorpos específicos marcados pela fluoresceína para detecção dos corpos de inclusão intracitoplasmáticos. Todo o processo é, assim, mais exigente em termos técnicos, mais prolongado e mais dispendioso do que o PCR (Sykes, 2004).

Os restantes métodos de diagnóstico acarretam menor sensibilidade e especificidade do que o PCR (Gruffydd-Jones et al., 2009). A elaboração de esfregaços conjuntivais, e posterior coloração com Giemsa (Gruffydd-Jones et al., 2009), Diff-Quick ou Papanicolau (Ramsey, 2000) para pesquisa dos corpos de inclusão (Gruffydd-Jones et al., 2009), não é considerada fiável, sendo os falsos positivos comuns, quer devido à presença de grânulos de melanina (Sykes, 2004), quer devido à extrusão de material nuclear durante o processamento das amostras. Os corpos de inclusão são basófilos (Ramsey, 2000) e surgem em grupos no citoplasma (Rand, 2006) das células epiteliais da conjuntiva, muitas vezes adjacentes ao núcleo (Ramsey, 2000). Mantêm-se visíveis, por norma, apenas durante as primeiras duas semanas, diminuindo em número com a cronicidade (Rand, 2006). Observa-se ainda, com frequência, infecção bacteriana secundária pela microbiota

residente. Na fase precoce da doença, o neutrófilo constitui o tipo celular predominante (Ramsey, 2000).

A detecção de antígeno por ELISA pode revelar-se útil no caso de outros métodos mais sensíveis não se encontrarem à disposição (Sykes, 2004), realizando-se a partir de raspagens conjuntivais. Se a amostra contiver um número muito elevado de bactérias, podem ocorrer falsos positivos (Rand, 2006). A aplicação da técnica de imunofluorescência directa a raspagens conjuntivais apresenta uma sensibilidade questionável, devendo colher-se a amostra previamente a qualquer instilação de fluoresceína no olho do animal (Ramsey, 2000).

3.4.1.5.2 Serologia

A importância atribuída a este método complementar de diagnóstico varia consideravelmente em função da referência bibliográfica consultada. Gruffydd-Jones e colegas (2009) consideram que a detecção de anticorpos, por imunofluorescência ou por ELISA, pode ser útil na confirmação do diagnóstico em gatos não vacinados. Segundo estes autores, a serologia apresenta particular interesse na atribuição do estatuto endémico a um grupo e na investigação de casos com sinais oculares crónicos. Também Sykes (2004) afirma existir uma boa correlação entre a presença de anticorpos e a ocorrência recente de infecção. Crispin (2005), ao invés, é da opinião que a serologia tem um valor limitado, uma vez que um título baixo não determina um diagnóstico efectivo de clamidiose, ao passo que um título elevado pode indicar, mas não confirma, a presença da bactéria. A BSAVA (2000) refere a utilização de serologias emparelhadas, que ajudam a confirmar o diagnóstico se revelarem um título crescente de anticorpos, em animais que nunca tenham sido vacinados. Ramsey (2000) salienta a importância de interpretar os resultados em conjunto com o quadro clínico.

3.4.1.6 Tratamento

Recomenda-se a instituição de antibioterapia sistémica, de preferência com uma tetraciclina (Sykes, 2004); alguns autores advogam a combinação da terapêutica sistémica com a administração tópica de um antibiótico do mesmo grupo (BSAVA, 2000).

3.4.1.7 Profilaxia médica

Encontram-se disponíveis, como parte de preparações multivalentes, vacinas vivas atenuadas e inactivadas, que apenas devem ser utilizadas em gatos nos quais se tenha confirmado a presença da bactéria ou que apresentem risco de exposição ao agente, particularmente aqueles que se encontram num ambiente com grande densidade de animais ou em que haja história prévia de doença por *C. felis* (Gruffydd-Jones et al., 2009). No nosso

país, existem duas vacinas multivalentes para administração subcutânea que incluem esta bactéria na sua formulação, sob a forma viva atenuada (CESA, 2006).

A vacinação inicia-se normalmente às 8-10 semanas de idade, fazendo-se uma segunda aplicação 3-4 semanas depois. Para os indivíduos que permanecerem em situação de risco, recomenda-se realizar um reforço anual (Gruffydd-Jones et al., 2009). A ocorrência de infecção (Sykes, 2004) e a excreção do agente (Ramsey, 2000) não são evitadas, mas os sinais clínicos são minimizados (Sykes, 2004). A redução na gravidade do quadro clínico atribui-se à indução de imunidade humoral e celular (Ramsey, 2000), com especial importância da resposta celular, devido à localização intracelular da bactéria. Podem surgir, 7 a 21 dias após a administração da vacina, reacções atípicas como febre, letargia, anorexia e claudicação (Sykes, 2004).

3.4.2 Manifestações oculares

3.4.2.1 Conjuntivite

É a manifestação clínica mais importante (Gruffydd-Jones et al., 2009). Começa, como foi referido anteriormente, por ser unilateral, tornando-se bilateral após alguns dias (Crispin, 2005). Pode revelar-se exuberante (Gruffydd-Jones et al., 2009), com aparecimento de hiperémia conjuntival (Rand, 2006), blefarospasmo, desconforto ocular e quemose. Esta última é típica da infecção por *C. felis* (Gruffydd-Jones et al., 2009). O corrimento ocular, inicialmente seroso, passa subsequentemente, devido a co-infecção por bactérias oportunistas (Ramsey, 2000), a mucoso ou mucopurulento (Gruffydd-Jones et al., 2009).

A opinião sobre o desfecho desta conjuntivite parece diferir entre os vários autores. Ramsey (2000) afirma que, na maior parte dos casos, o quadro é auto-limitante, citando Petersen (1998), segundo o qual os sinais regredem espontaneamente em duas a seis semanas nos gatinhos e em menos de duas semanas nos gatos mais velhos. O autor refere, contudo, que em algumas situações se desenvolve sintomatologia crónica (Ramsey, 2000). Sykes (2004), Ramsey e Tennant (2001), pelo contrário, defendem que a persistência da conjuntivite por vários meses é frequente.

Na conjuntivite crónica verifica-se uma redução no volume do corrimento ocular. A quemose e o blefarospasmo tornam-se menos exuberantes (Ramsey, 2000), a conjuntiva sofre um espessamento e surgem folículos linfóides na superfície medial anterior da membrana nictitante. Desenvolve-se uma hiperplasia conjuntival crónica (Slatter, 2001) com presença, em alguns casos, de um corrimento mucoso intermitente (Ramsey, 2000). Se não houver intervenção médica, a doença pode prolongar-se durante meses (Slatter, 2001).

Ocasionalmente, esta bactéria causa *ophthalmia neonatorum* nos recém-nascidos, podendo observar-se no aspecto medial dos bordos palpebrais a presença de exsudado. A infecção é transmitida, presumivelmente, durante o parto, a partir da vagina da progenitora (Ramsey,

2000), acedendo o agente à conjuntiva dos gatinhos por ascensão através do ducto nasolacrimal (Petersen, 1988 citado por Ramsey, 2000).

3.4.2.1.1 Tratamento

A infecção por *C. felis* é tratada com antibióticos, sendo a administração sistémica mais eficaz que a aplicação tópica (Sparkes, Caney, Sturgess & Gruffydd-Jones, 1999). As tetraciclinas constituem, por norma, a escolha mais indicada (Sykes, 2004), destacando-se, dentro deste grupo, a doxiciclina (Dean, Harley, Helps, Caney & Gruffydd-Jones, 2005), que tem a vantagem de requerer uma única administração diária, numa dose de 10 mg/kg, por via oral (Gruffydd-Jones et al., 2009). Em Portugal, ela encontra-se disponível sob a forma de um medicamento veterinário designado Ronaxan® (CESA, 2006). O tratamento deve manter-se por um período mínimo de quatro semanas, podendo ocorrer exacerbação dos sinais se for interrompido precocemente (Dean et al., 2005). Após a resolução dos sinais clínicos, recomenda-se que o animal continue a receber doxiciclina durante duas semanas (Gruffydd-Jones et al., 2009).

No caso dos gatos mais jovens e das fêmeas gestantes, quando os efeitos secundários das tetraciclinas constituem uma preocupação (Gruffydd-Jones et al., 2009), existem alternativas viáveis. A enrofloxacin e a pradofloxacin são ambas eficazes (Gerhardt, Schulz, Werckenthin & Hartmann, 2006; Hartmann, Helps, Lappin, Werckenthin & Hartmann, 2008), mas a amoxicilina com ácido clavulânico, administrada durante quatro semanas, representa provavelmente a escolha mais segura para os gatinhos (Sturgess, Gruffydd-Jones, Harbour & Jones, 2001). A dose indicada é, por via oral, 12 a 25 mg/kg, de doze em doze horas (Crispin, 2005). Outras opções referidas na literatura são a eritromicina (Crispin, 2005) e a azitromicina (Rand, 2006). A azitromicina, devido ao seu tempo de semi-vida relativamente longo (Hunter et al., 1995 citado por Owen, Sturgess, Harbour, Egan & Gruffydd-Jones, 2003), que sugere poder ser administrada com menor frequência, suscitou o interesse de Owen e colegas (2003), que elaboraram assim um estudo para comparar esta molécula à doxiciclina, verificando que, embora a azitromicina levasse inicialmente a uma rápida resolução do quadro clínico, houve recorrência da infecção em quatro dos cinco gatos tratados e apenas o recurso à doxiciclina tornou possível a eliminação da bactéria.

Nos casos crónicos, em que há infecção persistente, é possível que a *C. felis* seja mais difícil de eliminar. As situações de doença recorrente, contudo, surgem maioritariamente em instalações com números muito elevados de animais, e o problema reside, em regra, na falta de *compliance* do proprietário (Sykes, 2004). É importante que, nestas circunstâncias, seja instituída antibioterapia sistémica em todos os indivíduos durante pelo menos quatro semanas (Crispin, 2005), devendo tomar-se igual atenção ao cumprimento das medidas de profilaxia sanitária (Sykes, 2004), evitando-se deste modo que, devido à presença de portadores (Crispin, 2005), haja re-infecção cíclica dentro do grupo (Owen et al., 2003).

A administração tópica de tetraciclina é referida por vários autores (Crispin, 2005; Ramsey, 2000; Rand, 2006), sendo aconselhada por algumas referências a adopção de um tratamento conjunto sistémico e tópico (BSAVA, 2000). De facto, os trabalhos de Sparkes e colegas (1999) demonstraram que a doxiciclina sistémica é superior à clortetraciclina tópica, mas ambas são eficazes. Para o tratamento tópico, as substâncias indicadas são a oxitetraciclina e a clortetraciclina (Crispin, 2008a; Rand, 2006). Em Portugal, como se mencionou a propósito do HVF-1, encontra-se disponível uma pomada oftálmica, denominada Terricil[®], que contém oxitetraciclina (Infarmed, 2010f). Rand (2006) recomenda aplicar este medicamento 3 a 4 vezes por dia, durante 2 a 4 semanas. Há que ter atenção, contudo, ao facto de estes medicamentos nem sempre serem bem tolerados pelos gatos (Crispin, 2005), podendo desenvolver-se uma reacção de hipersensibilidade, caracterizada por hiperémia conjuntival, blefarospasmo e, por vezes, blefarite marginal, que implica o descontinuação da terapêutica (Ramsey, 2000).

3.5 *Mycoplasma* spp.

3.5.1 Introdução

3.5.1.1 Caracterização do agente

Os *Mycoplasma* spp. pertencem à classe Mollicutes, ordem *Mycoplasmatales* (Walker, 2003), família *Mycoplasmataceae* (Quinn, Markey, Carter, Donnelly & Leonard, 2002).

Os membros da classe Mollicutes, colectivamente designados por mycoplasmas, são bactérias de pequenas dimensões, incapazes de sintetizar peptidoglicano ou respectivos precursores (Quinn et al., 2002), pelo que não possuem parede celular. A envolvê-los têm, assim, uma membrana trilaminar simples constituída por proteínas, glicoproteínas, glicolípidos, fosfolípidos e esteróides. São organismos pleomórficos, podendo apresentar-se sob uma forma esférica, piriforme, espiralada ou filamentosa e, embora sejam classificados como Gram negativos, não coram satisfatoriamente pelo método de Gram (Walker, 2003).

A ausência de parede celular torna-os resistentes à acção dos antibióticos que interferem com a síntese desta estrutura (Walker, 2003), como é o caso da penicilina. Mostram-se, porém, bastante sensíveis à desidratação (Quinn et al., 2002), ao calor e à maioria dos detergentes e desinfetantes, como os compostos de amónio quaternário, o iodo e os compostos à base de fenol (Walker, 2003). Em geral, sobrevivem durante um tempo reduzido no exterior (Quinn et al., 2002), preferindo ambientes húmidos e frios. Se exceptuarmos os géneros *Anaeroplasma* e *Asteroplasma*, são anaeróbios facultativos (Walker, 2003).

3.5.1.2 Epidemiologia

Dentro dos *Mycoplasma* spp., a espécie *Mycoplasma felis* é, segundo a maior parte das referências, aquela que se encontra envolvida na síndrome coriza (Crispin, 2005; Crispin, 2008a; Gaskell & Bennett, 1999; Quinn et al., 2002; Walker, 2003;). Os indivíduos susceptíveis adquirem a infecção predominantemente por contacto directo, embora em ambientes confinados, como gatis e lojas de animais, possa também ocorrer transmissão aerógena. A prevalência é, aliás, superior neste tipo de espaços sobrepovoados (Rand, 2006). A contagiosidade desta bactéria não é, contudo, muito elevada, ao contrário do que acontece com os outros agentes de coriza (Slatter, 2001).

Quanto ao potencial zoonótico, não se considera significativo, uma vez que os mycoplasmas patogénicos exibem uma grande especificidade em relação ao hospedeiro (Walker, 2003).

3.5.1.3 Patogenia

A importância do *M. felis* no desenvolvimento de doença continua por esclarecer. As diferentes fontes bibliográficas questionam-se se ele constitui de facto uma causa primária ou actua apenas na presença de outros agentes, como o HVF-1 e a *C. felis* (Crispin, 2008a; Gaskell & Bennett, 1999; Stiles, 2006; Whitley, 2000). Veir e colegas (2008) investigaram gatos com sinais de coriza, provenientes de uma associação de protecção aos animais, constatando a ausência de qualquer agente primário (HVF-1, CVF, *B. bronchiseptica* e *C. felis*) em nove indivíduos. Em sete destes, foi isolado *Mycoplasma* spp., levando os autores a considerar a possibilidade de ele desempenhar um papel primário (Veir et al., 2008). Uma situação semelhante foi verificada por Spindel e colegas (2008), em cujo estudo 5% dos animais afectados por um episódio de coriza apenas estavam infectados com *Mycoplasma* spp. Não obstante, existem relatos do isolamento de *M. felis* em conjuntivas de indivíduos saudáveis (Stiles, 2006), o que contribui para a controvérsia.

Os mycoplasmas apresentam, por via de regra, tropismo para as mucosas, aderindo às células do hospedeiro e produzindo substâncias que causam lesão celular (Quinn et al., 2002). No caso do *M. felis*, o alvo primário é a conjuntiva, desenvolvendo-se conjuntivite (Crispin, 2008a; Rand, 2006; Stiles, 2006;). Nos trabalhos de Low e colegas (2007), o *Mycoplasma* spp. constituiu o organismo mais prevalente e foi detectado em significativamente mais animais com conjuntivite do que em animais saudáveis. Em alguns indivíduos, parece, assim, ter intervindo na patogenia da doença (Low et al., 2007). Tais resultados contrastam com as afirmações de Whitley (2000), segundo as quais a patogenicidade deste agente para a conjuntiva é questionável. O *M. felis* foi ainda recentemente implicado em dois casos de artrite (Liehmann, Degasperi, Spargser & Niebauer, 2006) e pode, inclusivamente, segundo Gaskell e Bennett (1999), causar alterações do aparelho reprodutor. Adicionalmente, em vários casos de pneumonia, isolou-se *Mycoplasma* spp., sem presença de outros agentes, o que indica que ele pode ser a

causa primária (Foster, Barrs, Martin & Malik, 1998; Foster, Martin, Allan, Barrs & Malik, 2004; Trow, Rozanski & Tidwell, 2008). O *Mycoplasma* spp. foi ainda identificado num caso de piotórax (Barrs, Allan, Martin, Beatty & Malik, 2005). Em circunstâncias normais, este microorganismo não se encontra no tracto respiratório inferior felino, sendo isolado em aproximadamente 25% dos casos de bronquite crónica (Padrid et al., 1991 citado por Willoughby & Bennett, 2004; Randolph et al., 1993 citado por Willoughby & Bennett, 2004). No âmbito dos mycoplasmas de interesse para o gato, temos ainda o *Mycoplasma gateae*. Segundo Willoughby e Bennett (2004), ele é provavelmente um comensal normal da conjuntiva e do tracto respiratório superior, com reduzido potencial patogénico nestas regiões anatómicas. Pode, contudo, estar envolvido em artrites e tenossinovites (Quinn et al., 2002). Foi ainda identificado, segundo Gray, Ketrings e Tang (2005), num caso de queratite ulcerativa. Os mesmos autores isolaram *M. felis* em seis outros casos similares (Gray et al., 2005), o que é surpreendente, tendo em conta que a literatura disponível não refere a possibilidade de envolvimento da córnea nas manifestações oculares deste agente (Walker, 2003).

3.5.1.4 Quadro clínico

O quadro clínico compreende essencialmente sinais de conjuntivite. Pode também observar-se sintomatologia ligeira do tracto respiratório superior, como espirros e corrimento nasal seroso (Rand, 2006). O curso normal da doença, na ausência de tratamento, é de 30 a 60 dias (Crispin, 2008a).

3.5.1.5 Métodos complementares de diagnóstico

O isolamento desta bactéria realiza-se a partir de zaragatoas conjuntivais. Anteriormente à colheita da amostra, é conveniente remover os exsudados oculares com soro fisiológico estéril para reduzir a contaminação por agentes secundários (Rand, 2006). O envio do material biológico para o laboratório deve ser feito sob refrigeração, num meio de transporte específico, como o meio de Stuart ou o meio de Amies sem carvão. Se estiver previsto um tempo de transporte superior a 24 horas, as amostras devem ser congeladas. Após a chegada ao laboratório, realiza-se então a cultura (Walker, 2003), que requer um meio específico (Crispin, 2008a), dado que os mycoplasmas são organismos fastidiosos. O crescimento dá-se de forma lenta, sendo as colónias de pequena dimensão e de difícil visualização a olho nu, exibindo, quando observadas com microscópio, uma aparência de “ovo estrelado”. Esta característica deve-se à implantação em profundidade da colónia na zona central, havendo na periferia apenas um crescimento superficial (Walker, 2003).

A técnica de PCR também se encontra disponível para detectar *Mycoplasma* spp., tendo sido executada em diversos trabalhos a partir de zaragatoas nasais, orofaríngeas (Veir et al., 2008) e conjuntivais (Low et al., 2007), ou recorrendo a *flush* nasal e biopsias da

cavidade nasal (Johnson, Drazenovich & Foley, 2004). Estes últimos autores concluíram que a detecção por PCR providencia resultados equivalentes aos da cultura bacteriana, e que o *flush* nasal e a biopsia nasal são métodos de colheita de amostra com eficácia semelhante entre si (Johnson et al., 2004).

É ainda possível elaborar raspagens conjuntivais, corando posteriormente com Diff-Quik, para revelar a presença de pequenos corpos de inclusão basófilos, de formato cocóide ou cocobacilar, na periferia do citoplasma das células epiteliais. Nestas amostras observa-se igualmente uma resposta celular constituída predominantemente por neutrófilos (Rand, 2006).

3.5.1.6 Tratamento

As fontes consultadas referem apenas a instituição de antibioterapia por via tópica (Crispin, 2005; Crispin, 2008a; Rand, 2006; Stiles, 2006; Whitley, 2000).

3.5.1.7 Profilaxia

Devido à ausência de uma vacina eficaz, apenas é possível realizar uma profilaxia sanitária, a qual deverá socorrer-se das medidas gerais indicadas para a coriza no início desta revisão (Rand, 2006).

3.5.2 Manifestações oculares

3.5.2.1 Conjuntivite

A conjuntivite pode ser unilateral ou bilateral (Rand, 2006). Inicialmente, observa-se blefarospasmo, epífora e hiperémia conjuntival. Num período de duas semanas, o quadro evolui para uma conjuntivite pseudomembranosa (Crispin, 2008a), caracterizada pela presença de um exsudado espesso de cor branca (Rand, 2006). A conjuntiva apresenta-se pálida, espessada e quemótica (Crispin, 2008a) e, em casos crónicos, coberta de folículos linfóides. Numa fase mais precoce, o corrimento ocular tem uma natureza serosa, tornando-se depois mucopurulento (Rand, 2006).

A sintomatologia é assim bastante semelhante à da infecção por *C. felis*, podendo ser difícil determinar qual dos agentes é o responsável – na verdade, é possível que se encontrem ambos envolvidos, sendo as infecções mistas frequentes (Rand, 2006).

3.5.2.1.1 Tratamento

A conjuntivite por *Mycoplasma* spp. responde favoravelmente a uma variedade de antibióticos tópicos (Stiles, 2006), incluindo o cloranfenicol e a oxitetraciclina. Esta última é a mais utilizada, uma vez que existe frequentemente co-infecção por *C. felis*. Aplica-se de seis em seis horas (Rand, 2006), durante cinco a sete dias, havendo resolução dos sinais

clínicos em cerca de cinco dias. Há que ter em conta a possibilidade, já referida anteriormente, de esta terapêutica levar ao aparecimento de uma reacção de hipersensibilidade (Crispin, 2008a).

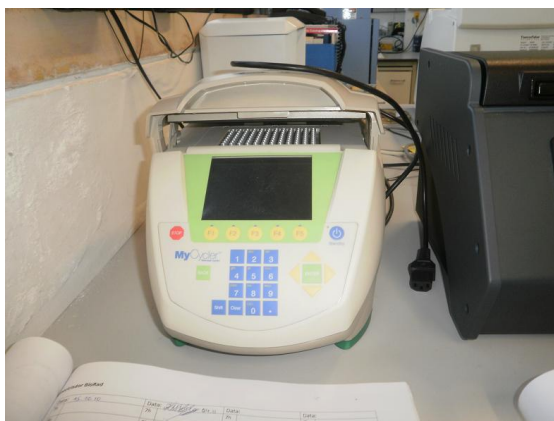
4. O PCR como método complementar de diagnóstico

4.1 Breve descrição da técnica

A técnica de PCR foi concebida por Kary Mullis em 1983. Trata-se de um método laboratorial que, com uma elegante simplicidade, permite amplificar um determinado segmento de DNA, desde que as sequências de nucleótidos que o flanqueiam sejam conhecidas (Nelson & Cox, 2005).

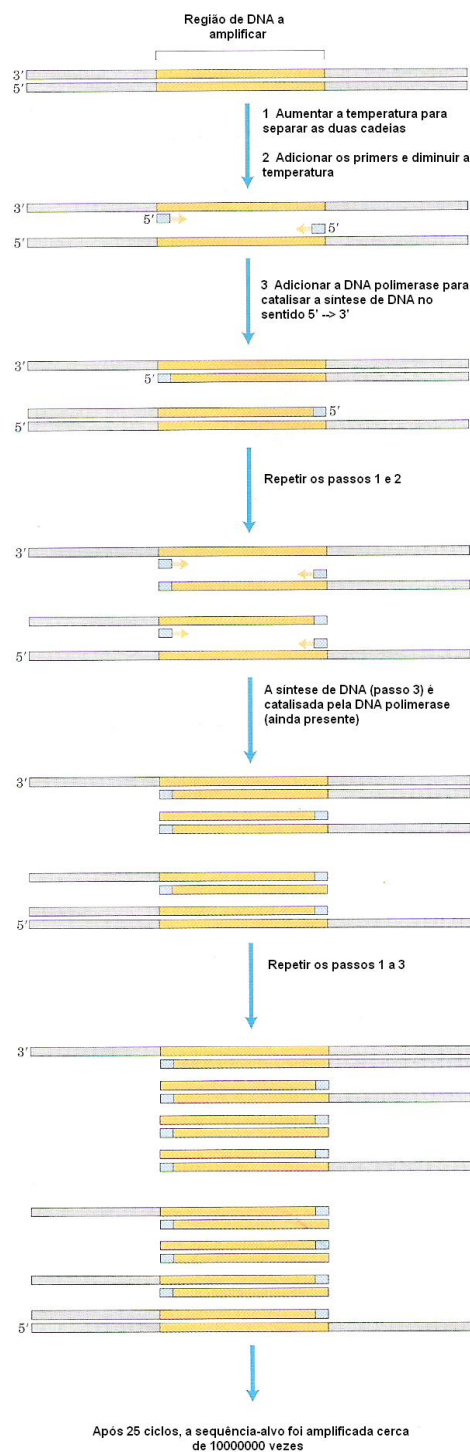
Para iniciar a reacção, é utilizado um par de *primers* ou iniciadores (Griffiths et al., 2005), que são oligonucleótidos com uma sequência de nucleótidos complementar às regiões flanqueadoras do fragmento a amplificar, contendo por norma cerca de 20 nucleótidos (Prescott et al., 2005). Cada iniciador liga-se a cada uma das cadeias de DNA (Griffiths et al., 2005), permitindo a ligação da DNA polimerase e o início da síntese de cada uma das cadeias do DNA-alvo (Nolte & Caliendo, 2007). A reacção inclui, para além do DNA a amplificar, uma DNA polimerase termoestável, os quatro desoxirribonucleótidos trifosfato e o par de *primers* (Prescott et al., 2005), para além do tampão de reacção apropriado (Nolte & Caliendo, 2007), realizando-se num termociclador (fig. 11) (Murphy et al., 1999), que permite que a mistura de reacção seja submetida a um conjunto de ciclos. Cada ciclo inclui um período de aquecimento, para desnaturação do DNA alvo, de arrefecimento, para ligação dos *primers* às sequências complementares do DNA alvo, e novamente de aquecimento, para a síntese de cada uma das cadeias a partir dos *primers* (fig. 12) (Nelson & Cox, 2005).

Fig. 11 Termociclador convencional (Original)



O PCR pode aplicar-se a uma grande variedade de campos científicos, incluindo a biologia molecular, a biotecnologia (Nelson & Cox, 2005), a genética, a medicina forense e o diagnóstico de doenças infecciosas, mostrando-se particularmente atractivo para o diagnóstico das infecções virais, devido à sua capacidade de detectar quantidades mínimas de material genético (Murphy et al., 1999).

Fig. 12 Amplificação de um segmento de DNA por PCR (adaptado de Nelson & Cox, 2005)



4.2 Detecção dos produtos amplificados

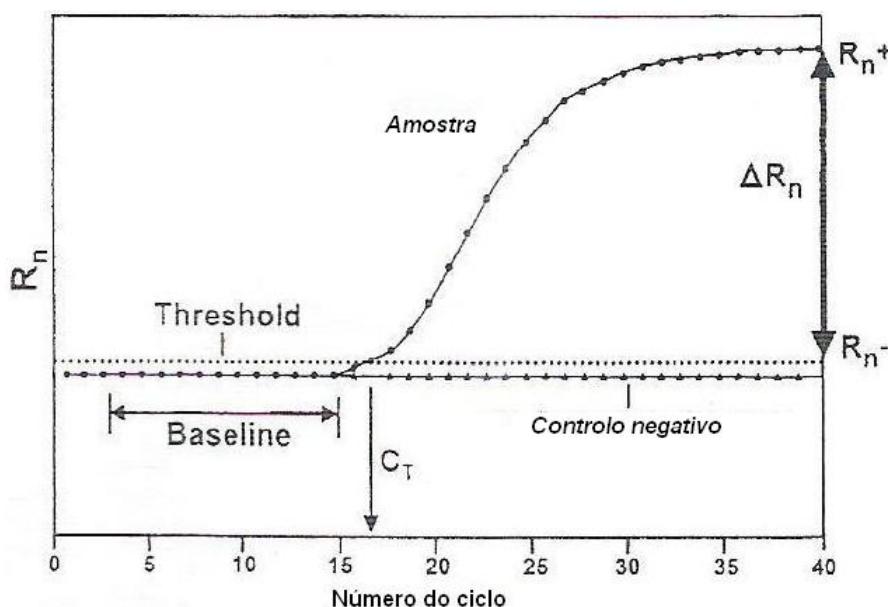
Após amplificação da sequência-alvo, faz-se a identificação dos produtos amplificados através da visualização dos produtos da reacção de PCR (Murphy et al., 1999).

A electroforese horizontal em gel de agarose permite fazer a observação dos segmentos de DNA amplificados, após coloração pelo brometo de etídio (Murphy et al., 1999), que fluoresce na presença de radiação ultravioleta, com capacidade de se intercalar na cadeia dupla de DNA (Addie & Ramsey, 2001). No gel de agarose são incluídos marcadores de peso molecular, a fim de se poder identificar o segmento pela sua dimensão. A identidade dos produtos da reacção pode ser confirmada por hidrólise com enzimas de restrição, se a região amplificada possuir os alvos específicos para essas enzimas, ou por sequenciação directa do fragmento (Murphy et al., 1999).

4.3 PCR *real-time*

Nesta modificação da técnica original, a amplificação da sequência e a detecção do produto final ocorrem simultaneamente, dentro do mesmo tubo. Para tal, são necessários termocicladores especiais, com sistemas de ópticas de precisão que monitorizam a emissão de fluorescência, a qual nos indica a quantidade de DNA amplificado. O termociclador é controlado por um *software* informático que processa os dados produzidos em cada ciclo e elabora um gráfico de amplificação em tempo real (fig. 13) (Nolte & Caliendo, 2007).

Fig. 13 Gráfico de amplificação (adaptado de Nolte & Caliendo, 2007)



R_n – fluorescência emitida Baseline – nível inicial de fluorescência
Threshold – limiar a partir do qual a emissão de fluorescência aumenta, indicando a detecção de DNA amplificado
 C_t – *Cycle threshold* (número do ciclo durante o qual a emissão de fluorescência ultrapassa o limiar)

A detecção é feita através de marcadores, como por exemplo o SYBR (Synergy Brands) Green, que emitem fluorescência quando se ligam ao DNA de cadeia dupla. Unem-se, assim, ao produto amplificado, emitindo fluorescência com uma intensidade proporcional à quantidade de produto. No entanto, uma vez que não são específicos, também se ligam a moléculas indesejadas, como os dímeros de *primers*, que vão deste modo contribuir para a fluorescência emitida (Nolte & Caliendo, 2007; Storch, 2007). Para distinguir estas duas situações, podemos utilizar as curvas de dissociação, que nos vão indicar qual é a T_m (*melting temperature*, temperatura de dissociação) (Storch, 2007). A T_m corresponde à temperatura a que as duas cadeias de DNA se dissociam (Nolte & Caliendo, 2007), libertando o marcador e diminuindo assim a fluorescência. Dado que se trata de um parâmetro que é afectado pelo comprimento e pela sequência do produto, a sua determinação permite diferenciar as sequências-alvo amplificadas das restantes moléculas (Storch, 2007).

Em alternativa ao SYBR Green, pode utilizar-se uma sonda, que funciona como um terceiro *primer*, complementar à região central do producto a amplificar. Esta sonda está marcada na extremidade 5' com um corante fluorescente (*reporter*) e na extremidade oposta com um *quencher*. A ligação da sonda à região complementar do DNA-alvo é realizada a temperaturas superiores àquelas em que ocorre a ligação dos *primers*. Aquando da síntese das novas cadeias, a actividade da exonuclease 3'-5' da DNA polimerase garante o deslocamento da sonda, implicando a emissão de fluorescência, que é medida e processada pelo termociclador. Esta modalidade de PCR *real-time* garante que toda a fluorescência assinalada durante o processo se deve à amplificação do producto específico (Dharmaraj, 2010).

Comparada com o PCR convencional, a técnica *real-time* apresenta numerosas vantagens. Uma vez que a acumulação de produto final é monitorizada dentro do tubo de reacção, não é necessário recorrer a um método de detecção separado, e a duração do processo é assim encurtada, por vezes para menos de uma hora. O recurso a marcadores fluorescentes com diferentes comprimentos de emissão possibilita ainda elaborar reacções *multiplex* com amplificação simultânea de várias sequências (Storch, 2007). Adicionalmente, o método *real-time* permite quantificar a quantidade de DNA amplificado (Nolte & Caliendo, 2007). Apresenta ainda maior sensibilidade e especificidade do que o PCR convencional (Gunson, Collins & Carman, 2006).

4.4 Aplicações do PCR na oftalmologia veterinária

O PCR revolucionou o diagnóstico microbiológico (Maggs, 2008), mostrando-se particularmente importante nas situações em que os antigénios microbianos e os anticorpos não podem ser detectados de outra forma, como acontece nas infecções virais latentes por herpesvírus e papilomavírus. O material genético do agente é, nestes casos, a única prova

de que existe uma infecção. Também para os vírus não cultiváveis ou difíceis de cultivar, como os adenovírus entéricos, os papilomavírus, os astrovírus e os rotavírus, e para aqueles que não causam qualquer efeito citopático, como o vírus sincicial respiratório, o vírus da diarreia bovina viral, os coronavírus e certos gamaherpesvírus, o PCR representa uma ferramenta muito útil. Pode ainda ser empregue no diagnóstico de agentes que se transmitem ao Homem, como o vírus da raiva, para assegurar uma maior segurança do pessoal de laboratório. Adicionalmente, esta técnica destaca-se como uma alternativa à serologia na diferenciação entre os vírus vacinais deletados e os vírus selvagens (Murphy et al., 1999).

Actualmente, a principal aplicação do PCR no âmbito da oftalmologia veterinária consiste na identificação do HVF-1 e das bactérias *C. felis* e *Mycoplasma* spp., tendo sido desenvolvidas várias técnicas, algumas das quais se encontram disponíveis comercialmente (Maggs, 2008). A detecção destes agentes é normalmente feita a partir de zaragatoas conjuntivais (Crispin, 2008a), embora em teoria se possa utilizar qualquer amostra de tecido no qual ocorra a presença do agente a pesquisar. Considerando que os agentes patogénicos descritos são parasitas intracelulares obrigatórios, os materiais biológicos com um elevado conteúdo de células são mais adequados. Assim, uma biopsia será preferível a uma raspagem, e esta a uma zaragatoa (Maggs, 2008).

**Capítulo II – Utilização do PCR
real-time na pesquisa de
herpesvírus felino - 1
e *Chlamydophila felis***

1. Objectivos

A coriza felina é uma síndrome comum na prática clínica, particularmente nos animais mais jovens. Ainda que o quadro clínico seja normalmente auto-limitante, alguns indivíduos desenvolvem sequelas crónicas ou recorrência dos sinais devido a persistência da infecção (Nelson & Couto, 2006). Nos gatis municipais e associações protectoras, uma vez que os agentes causais apresentam uma elevada contagiosidade, o problema generaliza-se com frequência a grande parte da população, revestindo-se de maior gravidade devido às características destes estabelecimentos, que geralmente predispõem ao desenvolvimento de doença. Para além dos custos envolvidos no tratamento, as taxas de adopção diminuem, optando-se em alguns casos pela eutanásia dos animais afectados a fim de deter a progressão da infecção (Dinnage, Scarlett & Richards, 2009).

Esta temática suscitou, assim, o interesse de diversos autores, tendo sido realizados numerosos trabalhos abordando a identificação de agentes primários, e também de organismos considerados secundários, em animais com e sem sinais de coriza, tanto em gatis e associações de protecção (Bannasch & Foley, 2005; Stiles & Pogranichniy, 2008; Veir et al., 2008) como em clínicas e hospitais (Cai et al., 2002; Low et al., 2007; Nasisse et al., 1998; Sykes et al., 1999). Em Portugal, estão descritos dois estudos em que se determinou a prevalência de HVF-1 e *C. felis* em gatos com sinais oculares, que provinham, tal como no nosso trabalho, da consulta de Oftalmologia do Hospital Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária (HEFMV). O PCR convencional foi o método complementar de diagnóstico utilizado (Duarte, Alberto, Delgado, Sales-Luís & Tavares, 2008; Duarte, Delgado, Sales-Luís & Tavares, 2005). A presente dissertação, ao fornecer dados relativamente ao emprego de uma técnica mais moderna, o PCR *real-time*, vem complementar a investigação já realizada pelos referidos autores. O nosso estudo teve assim o propósito de determinar a prevalência de HVF-1 e *C. felis* por PCR em gatos com e sem sinais oculares de coriza, de comparar os resultados do PCR convencional e *real-time* na detecção do HVF-1 e de verificar se existe uma correlação entre a carga de infecção destes dois agentes (quantificada pelo *real-time*) e os sinais clínicos observados. Pesquisou-se também a presença de correlações entre a sintomatologia e o sexo, idade e raça dos animais da amostra.

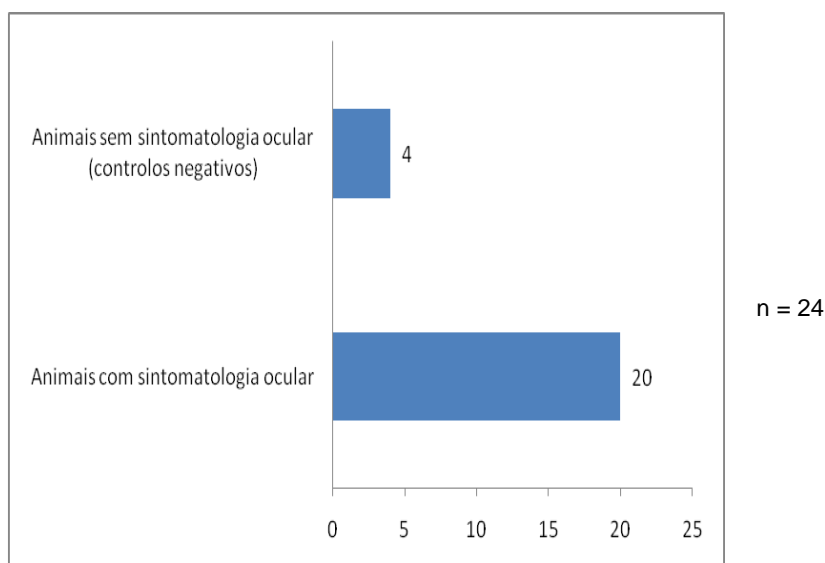
2. Material e métodos

2.1 Amostra populacional

Foram incluídos neste trabalho 24 felídeos (Anexo II), dos quais 20 mostravam sintomatologia ocular compatível com coriza (gráfico 1). Destes animais, 16 deslocaram-se ao HEFMV para uma consulta de especialidade de Oftalmologia, e os restantes 4 foram atendidos na Consulta Geral. Assim, oitenta por cento da nossa amostra de animais com sintomatologia provinha da consulta de Oftalmologia, e essa é a razão pela qual a maioria deles apresentava um quadro crónico ou recorrente. De facto, os gatinhos com sinais agudos de coriza são normalmente encaminhados para uma consulta geral, e apenas se os problemas oculares se complicarem são enviados para um especialista em Oftalmologia. Deste modo, estes jovens animais, que representam a maior parte dos casos de coriza (Nelson & Couto, 2006), encontram-se sub-representados no nosso estudo.

Quanto aos outros 4 animais, que serviram de controlos negativos, 2 encontravam-se completamente saudáveis, não se tendo apresentado no hospital. Dos restantes dois, 1 tinha sinais de atopia, mas não de coriza, pelo que foi avaliado na consulta de Dermatologia do HEFMV. O outro tinha sofrido recentemente enucleação do olho esquerdo, devido ao desenvolvimento de buftalmia consequente a queratoconjuntivite herpética, mostrando-se contudo o olho direito completamente normal. Idealmente, deveriam ter sido incluídos mais animais neste grupo; contudo, devido a restrições de carácter económico, tal não foi possível.

Gráfico 1 Composição da amostra populacional



Os dados de cada animal, assim como o diagnóstico e sintomatologia, foram obtidos a partir das fichas clínicas gerais e oftalmológicas e dos apontamentos recolhidos durante as consultas.

2.2 Sinais clínicos

Os 20 animais com sinais oculares foram classificados em relação à presença ou ausência dos seguintes parâmetros: queratite, conjuntivite, corrimento ocular, glaucoma, simbléfaro e sinais relativos ao tracto respiratório superior. A queratite foi ainda dividida em ulcerativa e não ulcerativa, e registaram-se os animais em que ocorreu sequestro da córnea. O corrimento ocular foi caracterizado como seroso, mucoso, purulento, mucopurulento, acastanhado ou não classificado.

A sintomatologia foi ainda classificada, quanto à sua gravidade, em ligeira, moderada ou severa, para o quadro geral (sinais oculares e do tracto respiratório superior) (tabela 1), e em ausente, ligeira, moderada ou severa, para o olho direito e olho esquerdo (tabela 2). O seu cálculo baseou-se na adição de pontos conforme os sinais clínicos apresentados, correspondendo uma pontuação mais elevada a uma maior gravidade da sintomatologia.

Tabela 1 Pontuação atribuída a cada sinal clínico para efeitos de classificação da gravidade do quadro geral

Quadro geral	
Queratite	1,5 pontos
ulcerativa	+ 0,5 pontos
com sequestro da córnea	+ 0,5 pontos
Conjuntivite	1 ponto
Corrimento ocular	0,5 pontos
Purulento	+ 0,5 pontos
Glaucoma	1 ponto
Simbléfaro	1 ponto
Sinais oculares bilaterais	1 ponto
Sinais do tracto respiratório superior	1 ponto

Tabela 2 Pontuação atribuída a cada sinal clínico para efeitos de classificação da gravidade da sintomatologia de cada olho

Classificação para cada olho	
Queratite	1,5 pontos
ulcerativa	+ 0,5 pontos
Com sequestro da córnea	+ 0,5 pontos
Conjuntivite	1 ponto
Corrimento ocular	0,5 pontos
Purulento	+ 0,5 pontos
Glaucoma	1 ponto
Simbléfaro	1 ponto

O valor assim obtido permitiu classificar a gravidade da sintomatologia em ligeira (≤ 2), moderada (>2 a 4) ou grave (>4) para o quadro geral, e em ausente (0), ligeira (>0 a $1,5$), moderada ($>1,5$ a <3) ou grave (≥ 3) para cada um dos olhos.

2.3 Colheita das amostras

A colheita do material utilizado na componente prática desta dissertação ocorreu entre Fevereiro e Junho de 2010, e teve lugar no HEFMV. Obtiveram-se amostras da orofaringe (fig. 15) e do saco conjuntival (fig. 14) de cada olho por esfregaço com zaragatoa. Em dois indivíduos não se fez o esfregaço orofaríngeo e em três não se fez o esfregaço conjuntival do olho esquerdo. Colheram-se assim 67 amostras.

Fig. 14 Realização de esfregaço conjuntival (Original).



Fig. 15 Realização de esfregaço orofaríngeo (cedido por Esmeralda Delgado)



Previamente aos esfregaços conjuntivais, era instilado no saco conjuntival um colírio anestésico com oxibuprocaína (Anestocil®, Laboratórios Edol, Lisboa, Portugal).

As zaragoas eram colocadas em *ependorfs* individuais e enviadas para o laboratório de Virologia da Faculdade de Medicina Veterinária (FMV), onde se mantinham refrigeradas até ao seu processamento.

2.4 Processamento laboratorial

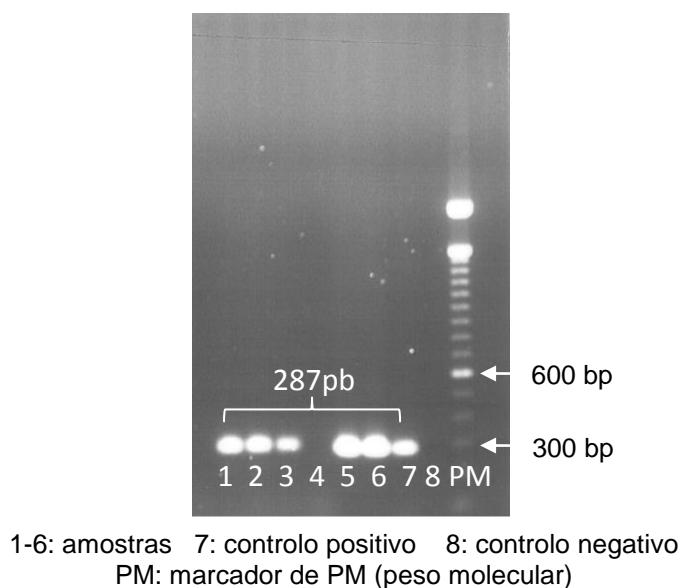
As zaragoas foram homogeneizadas em 200-300 µl de PBS (*phosphate buffered saline*, tampão fosfato salino) e colocadas no vortex, e o sobrenadante foi centrifugado a 13000 x g durante 10 minutos antes de ser colhido e processado para extracção de DNA total, utilizando o Kit de extracção Dneasy Blood and Tissue kit (Qiagen, Portugal), de acordo com as instruções do fabricante.

2.5 PCR

2.5.1 HVF-1

A pesquisa de HVF-1 por PCR convencional, que apenas se fez em 17 amostras (pertencentes a 6 animais do grupo com sinais oculares), realizou-se de acordo com Sykes, Allen, Studdert & Browning (2001). Brevemente, um fragmento de 287 bp incluído no gene viral da timidina quinase foi amplificado a partir de 10 µl de amostra, utilizando 50 pmol/µl de *primer forward* (5' GACGTGGTGAATTATCAGC 3') e de *primer reverse* (5' CAACTAGATTTCACCAGGA 3'), com o kit de PCR Fidelity Taq (GE Healthscience, EUA) 2 x concentrado e 2mM de concentração final de MgCl₂. Os fragmentos amplificados foram detectados por electroforese em gel de agarose e coloração com GelRed™ (fig. 16).

Fig. 16 Gel de agarose para detecção dos productos de amplificação do HVF-1 (Original)



As 67 amostras colhidas no total dos animais foram processadas por PCR *real-time*, utilizando para o efeito o *primer forward* 5' GACGTGGTGAATTATCAGCTGAAG 3', o *primer reverse* 5' AAGGTATGGTGC GGCAAATC 3' e a sonda 5' FAM TGCTGCCTATATCACCGCCCACTATCAA 3'TAMRA, nas concentrações de 900 nM para cada um dos *primers* e 250 nM para a sonda, em uso no laboratório de Virologia da FMV. O fragmento amplificado, de 97 bp, foi detectado pela emissão de fluorescência do corante FAM devido à deslocação da sonda pela actividade de exonuclease 5'-3' da DNA polimerase no aparelho de PCR *real-time* (fig. 17). O ciclo de amplificação incluiu um passo de desnaturação inicial de 95°C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos a 95°C durante 15 segundos e de 1 minuto a 60°C.

Fig. 17 Termociclador *real-time* (Original)



2.5.1.1 Carga viral

Para determinação da carga viral com o PCR *real-time*, foram efectuadas 7 diluições seriadas de base 10 (de 10^{-1} a 10^{-7}) do controlo positivo, um plasmídeo recombinante de 3287 bp (3000 bp pGEM T-easy + 287 bp fragmento inserido), de forma a estabelecer uma recta padrão. Para desenhar esta recta, era necessário conhecer o C_t e o número de cópias-alvo de cada diluição.

O C_t para cada amostra foi determinado como o número do ciclo no qual a fluorescência emitida ultrapassava o limite de detecção, aferido pelo aparelho (fig. 18 e tabela 3).

Fig. 18 Curva de amplificação dos controlos positivos do HVF-1 (Original)

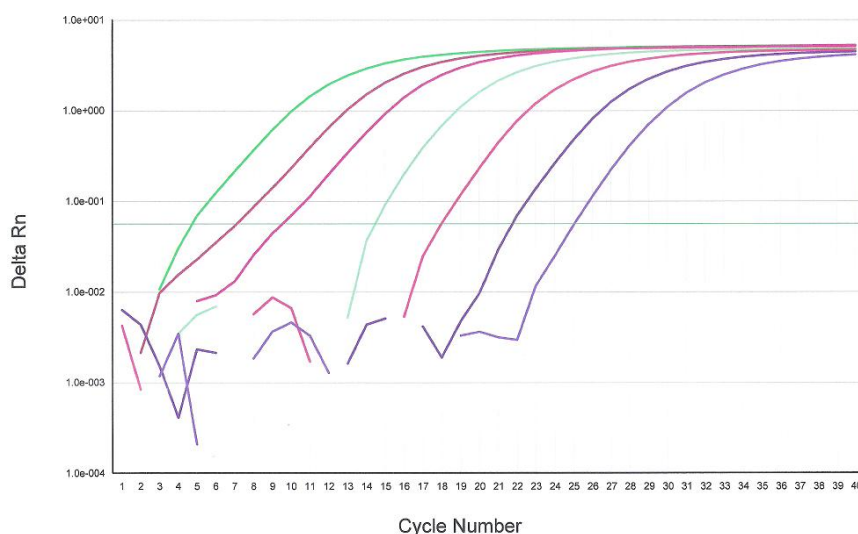


Tabela 3 C_t para cada um dos controlos positivos do HVF-1

Nome da amostra	C_t
Controlo positivo (diluição 10^{-1})	4,67
Controlo positivo (diluição 10^{-2})	7,09
Controlo positivo (diluição 10^{-3})	9,48
Controlo positivo (diluição 10^{-4})	14,36
Controlo positivo (diluição 10^{-5})	17,98
Controlo positivo (diluição 10^{-6})	21,68
Controlo positivo (diluição 10^{-7})	25,03

O número de cópias (em moléculas/ μl) no controlo positivo calculou-se a partir da concentração de DNA deste, medida previamente no aparelho Nanodrop 8000® (Thermo Scientific, EUA). Esta concentração era de 113 ng/ μl (equivalente a 113×10^{-9} g/ μl), o que corresponde a $31,31 \times 10^9$ moléculas/ μl , conforme os cálculos apresentados de seguida:

$$\begin{aligned} \text{Número de cópias-alvo (moléculas}/\mu\text{l}) &= [\text{concentração em g}/\mu\text{l} / (\text{número de pares de bases} \\ &\times \text{peso molecular médio de um par de bases})] \times \text{número de Avogadro} = \\ &= [113 \times 10^{-9} / (3287 \times 660)] \times 6,022 \times 10^{23} = \\ &= 31,31 \times 10^9 \text{ moléculas}/\mu\text{l} \end{aligned}$$

Calculou-se então o número de cópias-alvo correspondente a cada uma das diluições do controlo positivo (tabela 4). De seguida, para cada diluição, compararam-se os valores de C_t com o número de cópias alvo, de forma a construir uma recta padrão (fig. 19).

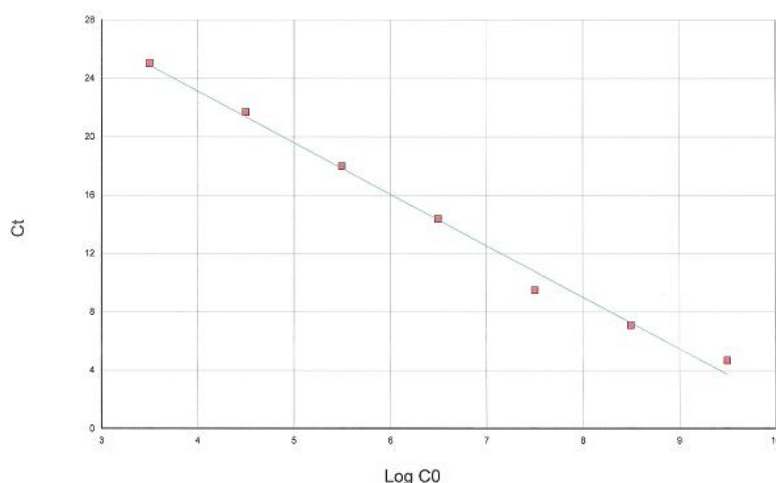
Os C_t de cada amostra foram avaliados em função desta recta de calibração, permitindo o cálculo da carga viral nas diferentes amostras.

Uma vez que neste PCR se utilizou um *volume constante* (e não uma massa constante) de material biológico, foi ainda necessário converter o número de cópias-alvo calculado em moléculas/ μl para *moléculas/ng*. Para isso, previamente à realização do PCR, a concentração de DNA de cada amostra, dada em ng/ μl , foi medida no Nanodrop 8000®, e de seguida multiplicada por 2 (uma vez que o volume utilizado foi de 2 μl), obtendo-se assim a massa total de DNA (em ng) por amostra. O número de moléculas/ μl obtido com o PCR dividiu-se por essa massa de DNA, ficando-se com o número de moléculas, ou seja, a carga viral, por ng.

Tabela 4 Concentração do controlo positivo em cada uma das diluições

Diluição	Concentração (nº de moléculas/ μl)
10^{-1}	$31,31 \times 10^8$
10^{-2}	$31,31 \times 10^7$
10^{-3}	$31,31 \times 10^6$
10^{-4}	$31,31 \times 10^5$
10^{-5}	$31,31 \times 10^4$
10^{-6}	$31,31 \times 10^3$
10^{-7}	$31,31 \times 10^2$

Fig. 19 Recta de calibração para o HVF-1 (Original)

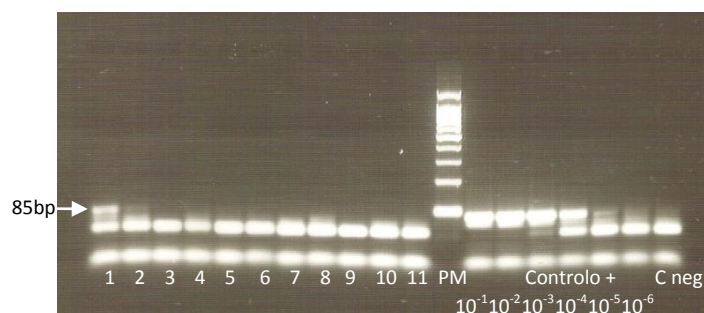


2.5.2 *C. felis*

A detecção de *C. felis* a partir do material extraído das 67 amostras foi efectuada com o sistema SYBR Green (Applied Biosystems, EUA), utilizando os *primers* calculados pelo programa Primer 3 com base na sequência da proteína de membrana (ompA) da *C. felis* (número de acesso Genbank AF269258.1). O fragmento amplificado de 85 bp foi detectado pela emissão de fluorescência do SYBR Green.

O ciclo de amplificação consistiu num passo de desnaturação inicial de 95°C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos a 95°C durante 15 segundos e 60°C durante 1 minuto, e um passo de dissociação final de 95°C durante 15 segundos, 60°C durante 30 segundos e 95°C durante 15 segundos, para aferir a T_m dos productos amplificados de forma a confirmar a sua especificidade, dado que o corante fluorescente SYBR Green se intercala entre todas as cadeias de DNA amplificadas, incluindo o producto específico e os productos inespecíficos, formados nomeadamente por dímeros dos *primers*. A positividade das amostras foi estabelecida pela T_m de cada uma delas na curva de dissociação calculada pelo aparelho (fig. 21 e tabela 5). Os produtos amplificados foram também observados em gel de agarose, após electroforese e coloração com GelRed™ (fig. 20).

Fig. 20 Gel de agarose para detecção dos productos de amplificação de *C. felis* (Original)



C neg – Controlo negativo

Fig. 21 Controlos positivo e negativo e amostra positiva para *C. felis* (Original)

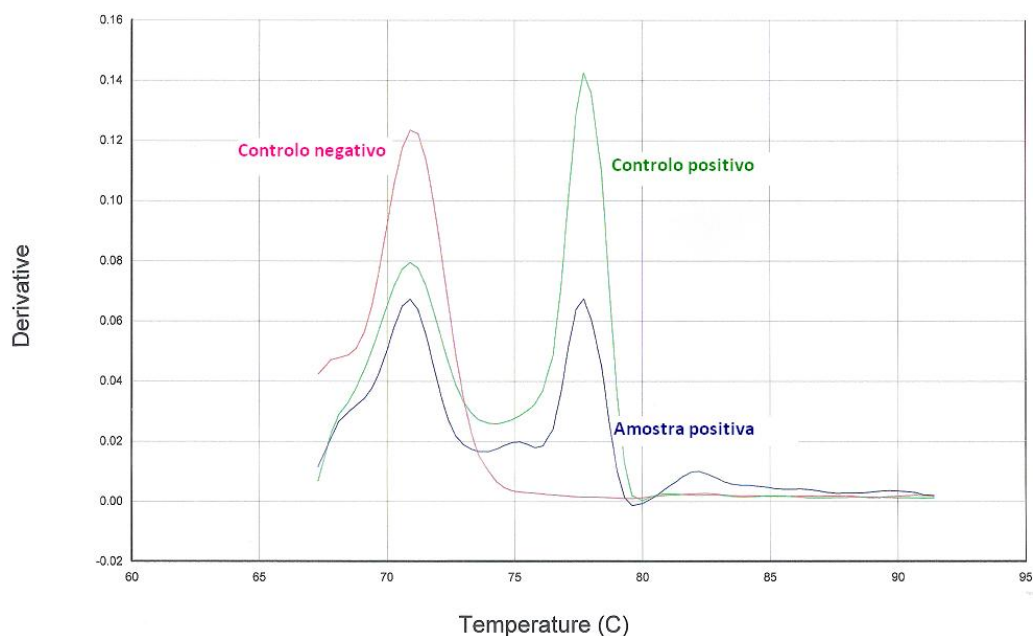


Tabela 5 C_t e T_m dos controlos positivo e negativo e da amostra positiva mostrados na fig.21

Nome da amostra	C_t	T_m (°C)
Controlo negativo	32,10	70,90
Controlo positivo	28,76	77,70
Amostra positiva	33,24	77,70

2.5.2.1 Carga bacteriana

A construção da recta padrão foi efectuada da mesma forma que para o HVF-1, utilizando, no entanto, um controlo positivo diferente, elaborado a partir do DNA total da vacina Fevaxyn® Pentofell (Fort Dodge, Irlanda), da qual se fizeram diluições seriadas.

A Fevaxyn® Pentofel contém FPLV (*feline panleucopenia virus*, vírus da panleucopénia felina), HVF-1 e *C. felis*. A potência relativa de cada agente foi multiplicada pela dimensão do respectivo genoma (em número de bases), obtendo-se o número de bases presente na vacina para cada um deles (tabela 6).

Tabela 6 Cálculo do número de bases presentes na vacina para cada um dos agentes

Agente	Potência relativa	Dimensão do genoma	Nº de bases
FPLV	10	6000 b	6×10^4 b
HVF-1	1,9	268000 b	51×10^4 b
<i>C. felis</i>	2,15	$2,4 \times 10^6$ b	516×10^4 b

Temos assim, na Fevaxyn ® Pentofel, um total de 573×10^4 bases [$(6 \times 10^4) + (51 \times 10^4) + (516 \times 10^4)$] . Com esta informação, podemos calcular a percentagem de material genético de cada um destes organismos:

- FPLV

O material genético total (100%) corresponde a 573×10^4 bases. As 6×10^4 bases pertencentes a este vírus representam, então, apenas 1,1%, segundo a regra de três simples:

$$\begin{array}{rcl} 573 \times 10^4 \text{ b} & \text{-----} & 100\% \\ 6 \times 10^4 \text{ b} & \text{-----} & x\% \end{array}$$

$$x = (6 \times 10^4 \times 100) / (573 \times 10^4) = 1,1\%$$

- HVF-1

Seguindo a mesma lógica que para o FPLV:

$$\begin{array}{rcl} 573 \times 10^4 \text{ b} & \text{-----} & 100\% \\ 51 \times 10^4 \text{ b} & \text{-----} & x\% \end{array}$$

$$x = 8,9\%$$

- *C. felis*

$$\begin{array}{rcl} 573 \times 10^4 \text{ b} & \text{-----} & 100\% \\ 516 \times 10^4 \text{ b} & \text{-----} & x\% \end{array}$$

$$x = 90\%$$

O genoma da *C. felis* corresponde, portanto, a 90% do DNA total. Mediu-se a concentração de DNA do controlo positivo no Nanodrop 8000 ®, tal como se fez para o controlo positivo do HVF-1, obtendo-se um valor de 41 ng/µl. Sabendo que 90% é da *C. felis*:

$$\begin{array}{l} 41 \text{ ng/}\mu\text{l} \text{ ----- } 100\% \\ x \text{ ng/}\mu\text{l} \text{ ----- } 90\% \end{array}$$

$$x = 36,9 \text{ ng/}\mu\text{l}$$

A concentração vai ser então, para esta bactéria, de 36,9 ng/µl, ou seja, $36,9 \times 10^{-9}$ g/µl, valor este que nos vai dar o número de cópias-alvo (em moléculas/µl) através da seguinte expressão:

$$\begin{aligned} \text{Número de cópias-alvo (moléculas/}\mu\text{l)} &= [\text{concentração em g/}\mu\text{l} / (\text{número de bases} \times \text{peso} \\ &\text{molecular médio de uma base})] \times \text{número de Avogadro} = \\ &= [36,9 \times 10^{-9} / (2,4 \times 10^6 \times 330)] \times 6,022 \times 10^{23} = \\ &= 28,3 \times 10^6 \text{ moléculas/}\mu\text{l} \end{aligned}$$

O número de cópias-alvo para cada uma das diluições utilizadas no PCR (tabela 7) insere-se no programa informático do aparelho *real-time*, que assim calcula o número de moléculas/µl em cada amostra testada. Depois, procede-se como para o HVF-1 – uma vez que também se utilizou um volume constante de 2 µl, multiplica-se a concentração de DNA obtida no Nanodrop 8000 ® por 2. O número de moléculas/µl em cada amostra é dividido pelo valor assim obtido, e temos deste modo o número de moléculas/ng.

Tabela 7 Concentração do controlo positivo em cada uma das diluições

Diluição	Concentração (nº de moléculas/ µl)
10^{-1}	$2,83 \times 10^6$
10^{-2}	$2,83 \times 10^5$
10^{-3}	$2,83 \times 10^4$
10^{-4}	$2,83 \times 10^3$
10^{-5}	$2,83 \times 10^2$
10^{-6}	28,3
10^{-7}	2,83

2.6 Análise estatística

Para fazer a análise estatística dos resultados, recorreu-se a dois programas - o Excel 2007 do Microsoft Office ® (Microsoft Corporation, EUA) e o IBM ® SPSS ® Statistics versão 19.0 (International business machines ® - IBM ® -, EUA). Os resultados são apresentados como média \pm desvio-padrão da média. Nas diferentes comparações estatísticas, foi utilizado um nível de significância (p) de 0,05.

A concordância entre os resultados do PCR convencional e PCR *real-time* para o HVF-1 foi calculada através da mesma expressão utilizada no estudo de Low e colegas (2007):

$$\text{Concordância} = [((\text{Conpos} + \text{Rtpos}) + (\text{Conneg} + \text{Rtneg})) / ((\text{Conpos} + \text{Rtpos}) + (\text{Conneg} + \text{Rtneg}) + (\text{Conpos} + \text{Rtneg}) + (\text{Conneg} + \text{Rtpos}))] \times 100$$

em que Conpos = resultados positivos por PCR convencional, Conneg = resultados negativos por PCR convencional, Rtpos = resultados positivos por PCR *real-time* e Rtneg = resultados negativos por PCR *real-time*.

3. Resultados

3.1 Características da amostra populacional estudada

3.1.1 Sexo

No total da amostra populacional, a distribuição por sexo foi de 13 casos (54,2%) do sexo masculino e 11 (45,8%) do sexo feminino (gráfico 2). Dentro dos animais com sintomatologia ocular, havia 10 (50%) machos e 10 (50%) fêmeas (gráfico 3), enquanto nos animais sem sintomatologia 3 (75%) dos indivíduos pertenciam ao sexo masculino e apenas 1 (25%) ao sexo feminino (gráfico 4).

Gráfico 2 Distribuição por sexo da amostra em estudo

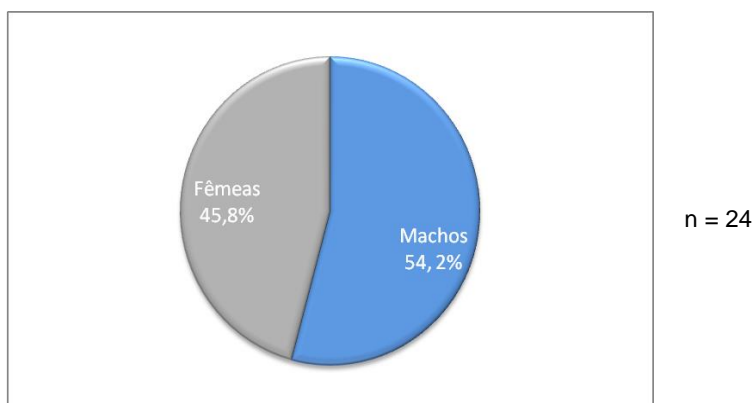


Gráfico 3 Distribuição por sexo nos animais com sintomatologia ocular

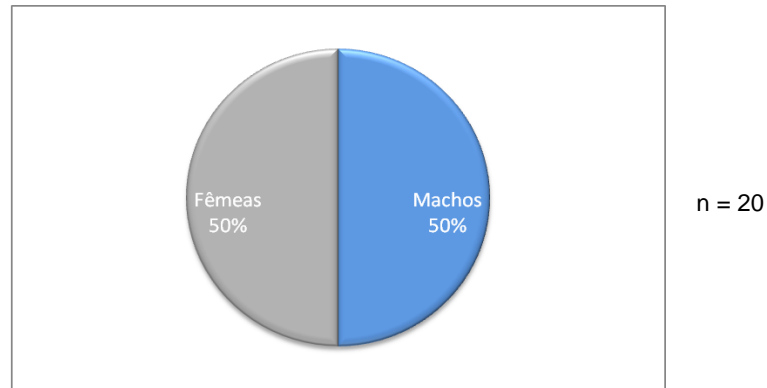
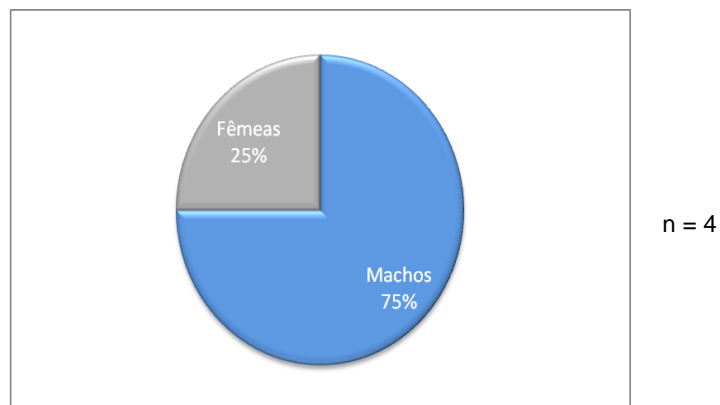


Gráfico 4 Distribuição por sexo nos indivíduos sem sinais oculares



3.1.2 Idade

No total da amostra estudada, verificou-se que a média de idades era de $4,6 \pm 4,5$ anos.

Dividindo a amostra em classes etárias, verificou-se que a classe entre 1 e menos de 5 anos era a que contabilizava um maior número de animais (gráfico 5).

Nos animais com sinais oculares, as idades oscilavam entre os 2 meses e os 14 anos, com uma média de $5,1 \pm 4,8$ anos. A classe etária entre 1 e menos de 5 anos foi aquela em que se registaram mais casos (gráfico 6).

Nos indivíduos sem sinais oculares, cujas idades se situavam entre os 11 meses e os 3 anos, a média era mais baixa ($1,98 \pm 0,8$ anos). A faixa entre 1 e menos de 5 anos de idade foi também aquela com maior número de indivíduos (gráfico 7).

Gráfico 5 Distribuição por idade na amostra em estudo

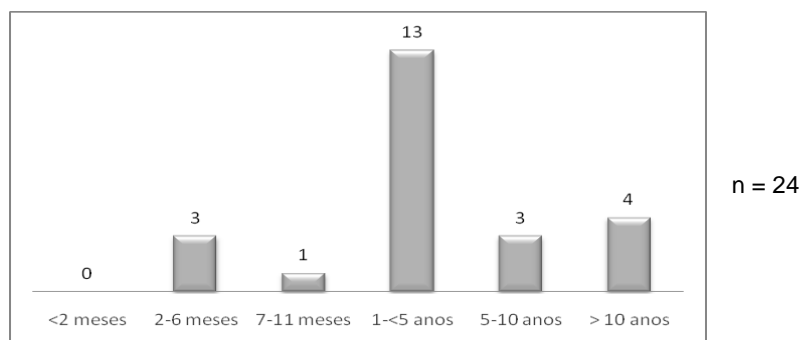


Gráfico 6 Distribuição por idade nos animais com sintomatologia ocular

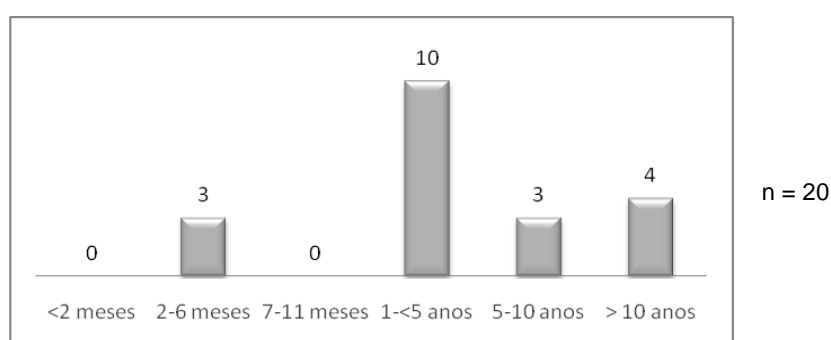
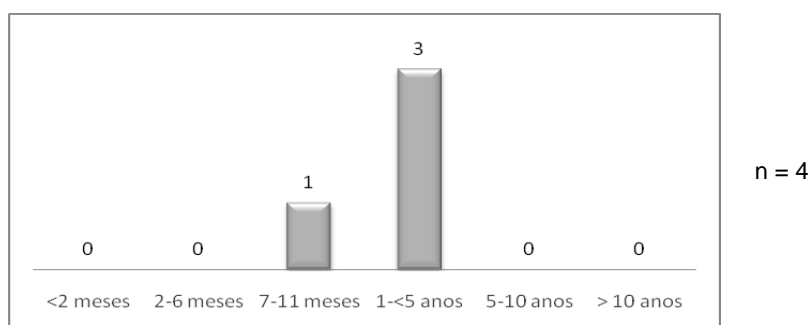


Gráfico 7 Distribuição por idade nos indivíduos sem sinais oculares



3.1.3 Raça

O Europeu Comum (EC) foi a raça mais representada, com cerca de 70% dos animais na amostra global. Seguiram-se, por ordem decrescente, o Persa e o Exótico. Participou ainda neste estudo 1 animal cruzado de Siamês com EC (gráfico 8).

Entre os animais que apresentavam sinais oculares, o EC foi também a raça mais assinalada (13 animais), seguindo-se, tal como na amostra global, o Persa (4 animais) e o Exótico (2 animais). Havia ainda um cruzado de Siamês com EC (gráfico 9).

Dentro do grupo sem sinais oculares, todos os gatos eram ECs (gráfico 10).

Gráfico 8 Distribuição por raça na amostra em estudo

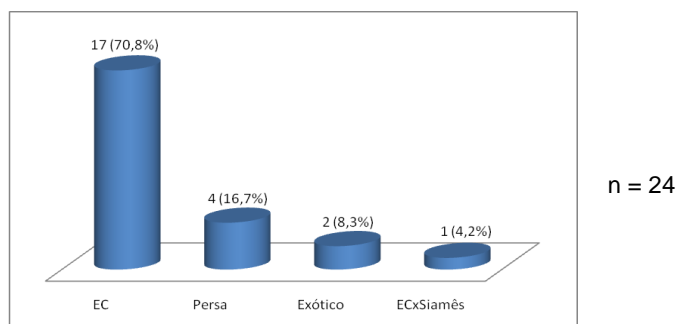


Gráfico 9 Distribuição por raça nos animais com sintomatologia ocular

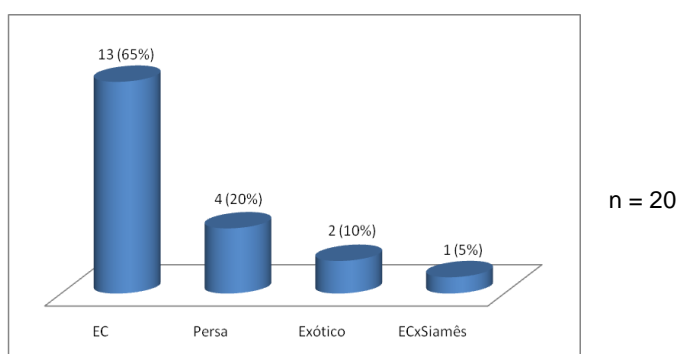
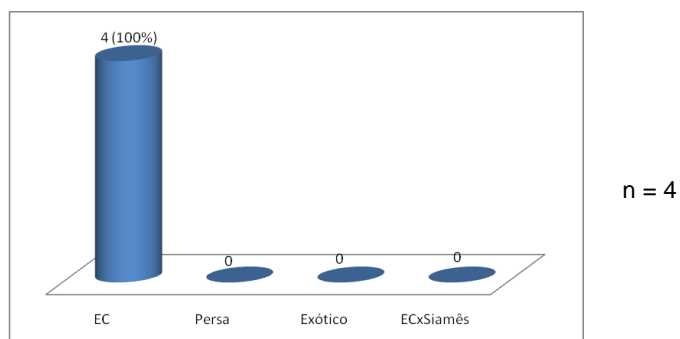


Gráfico 10 Distribuição por raça nos indivíduos sem sinais oculares



3.2 Sinais clínicos

3.2.1 Sinais oculares

Os sinais oculares eram unilaterais em 50% dos indivíduos (10/20) e bilaterais nos outros 50% (10/20). Do total de animais com sinais oculares (gráfico 11), 11 (55%) tinham queratite, sendo esta ulcerativa em 4 (36%) dos casos. Três (27,3%) dos indivíduos com queratite tinham sequestro da córnea. Em dois destes, o sequestro era unilateral, e o HVF-1 foi detectado no olho afectado. No outro gato, o sequestro era bilateral, mas o vírus só foi detectado num dos olhos. Não foi possível estabelecer uma relação entre a presença de sequestro da córnea e a carga viral detectada. Havia ainda um animal com queratite

eosinofílica, no qual não foi, contudo, possível detectar o HVF-1 em qualquer dos esfregaços.

Apenas 7 gatos (35%) apresentavam conjuntivite. O corrimento ocular foi o sinal registado com maior frequência, verificando-se em 12 (60%) gatos, e dividindo-se em seroso, mucoso, purulento, mucopurulento, acastanhado e não classificado (gráfico 12). As categorias com maior número de animais foram o purulento e o acastanhado.

A ocorrência de glaucoma apenas se verificou em 1 animal (5%). O simbléfaro afectava quatro (20%) indivíduos. A maioria dos indivíduos (70%) apresentava um quadro crónico ou recorrente.

Gráfico 11 Frequência dos diferentes sinais oculares

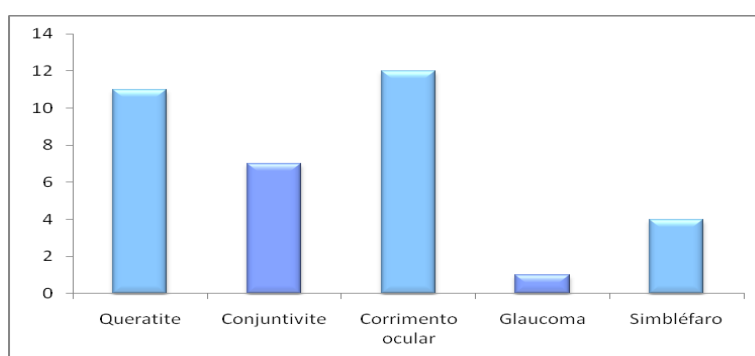
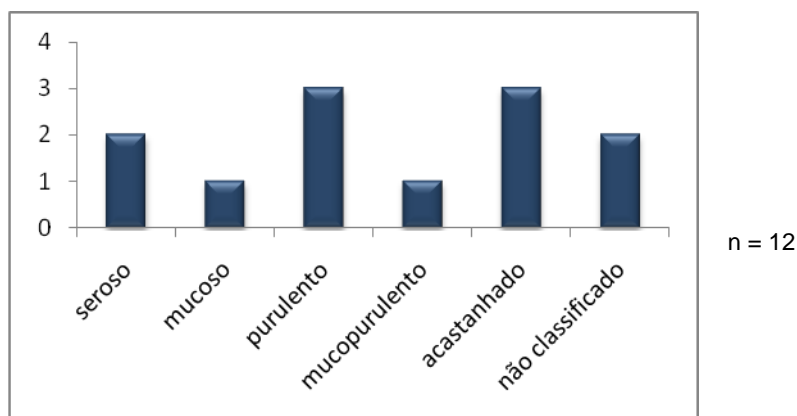


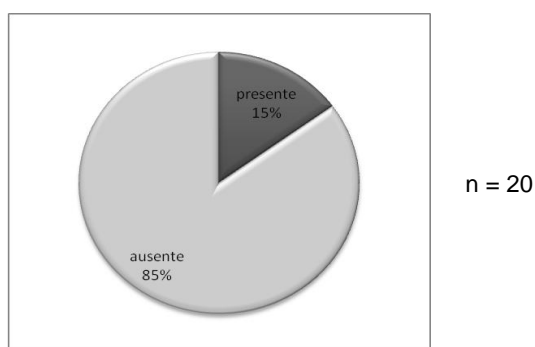
Gráfico 12 Classificação do corrimento ocular



3.2.2 Sinais do tracto respiratório superior

Dentro do grupo de animais com sintomatologia ocular, apenas 3 (15%) tinham sinais relacionados com o tracto respiratório superior, como espirros e corrimento nasal (gráfico 13). Nenhum dos indivíduos pertencentes ao grupo sem sinais oculares apresentava alterações respiratórias superiores.

Gráfico 13 Presença de sintomatologia relacionada com o tracto respiratório superior no grupo com sinais oculares

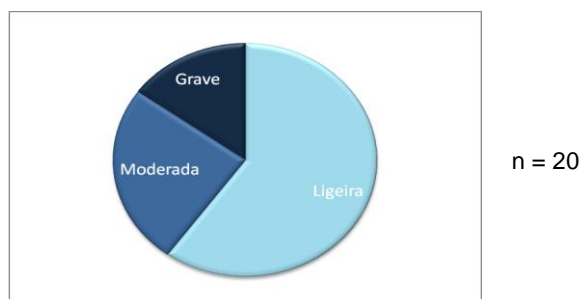


3.2.3 Gravidade da sintomatologia

3.2.3.1 Quadro geral

Variou entre 0,5 e 7 pontos, com uma média de $2,55 \pm 1,55$. A sintomatologia foi assim considerada ligeira em 12 (60%) animais, moderada em 5 (25%) e grave em 3 (15%) (gráfico 14).

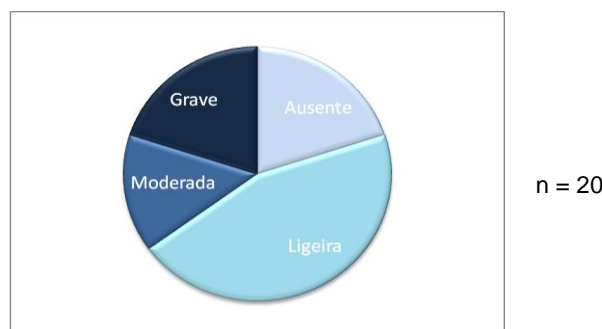
Gráfico 14 Gravidade do quadro geral nos indivíduos com sinais oculares



3.2.3.2 Olho direito

Verificou-se um valor máximo de 4 e um valor mínimo de 0, com média de $1,525 \pm 1,37$ pontos. A sintomatologia foi classificada como ausente em 4 (20%) indivíduos, ligeira em 9 (45%), moderada em 3 (15%) e grave em 4 (20%) (gráfico 15).

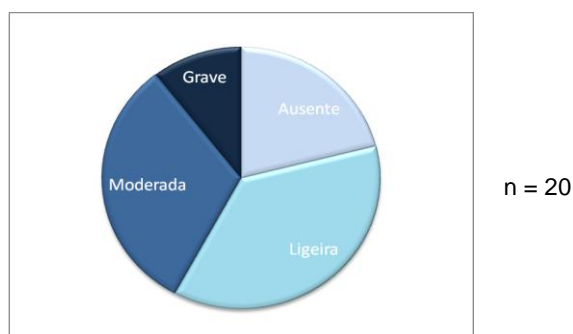
Gráfico 15 Gravidade da sintomatologia no olho direito



3.2.3.3 Olho esquerdo

Oscilou entre valores de 0 e 3, com média de $1,34 \pm 1,11$ pontos, tendo sido atribuída a classificação de ausente em 4 (21,1%) gatos, ligeira em 7 (36,8%), moderada em 6 (31,6%) e grave em 2 (10,5%) (gráfico 16).

Gráfico 16 Gravidade da sintomatologia no olho esquerdo



3.3 Resultados do PCR para o HVF-1

3.3.1 PCR convencional

Dentro dos 6 esfregaços orofaríngeos submetidos a esta modalidade de PCR, 3 (50%) obtiveram um resultado positivo e 3 (50%) um resultado negativo. Três (50%) dos 6 esfregaços conjuntivais no olho direito foram positivos e os outros 3 (50%) negativos. Apenas 5 esfregaços conjuntivais do olho esquerdo foram utilizados, tendo 3 deles (60%) sido considerados positivos e 2 (40%) negativos.

Considerando globalmente os 6 animais em que foi feito PCR convencional (que pertenciam todos ao grupo com sinais oculares), 4 tiveram pelo menos um resultado positivo. A prevalência foi, assim, de 66,7%.

3.3.2 PCR *real-time* (fig. 22 e 23)

Foi aplicado a todas as amostras, permitindo quantificar a carga viral inicialmente presente no material biológico.

Fig. 22 Curva de amplificação de duas réplicas de uma amostra positiva ao HVF-1 (Original)

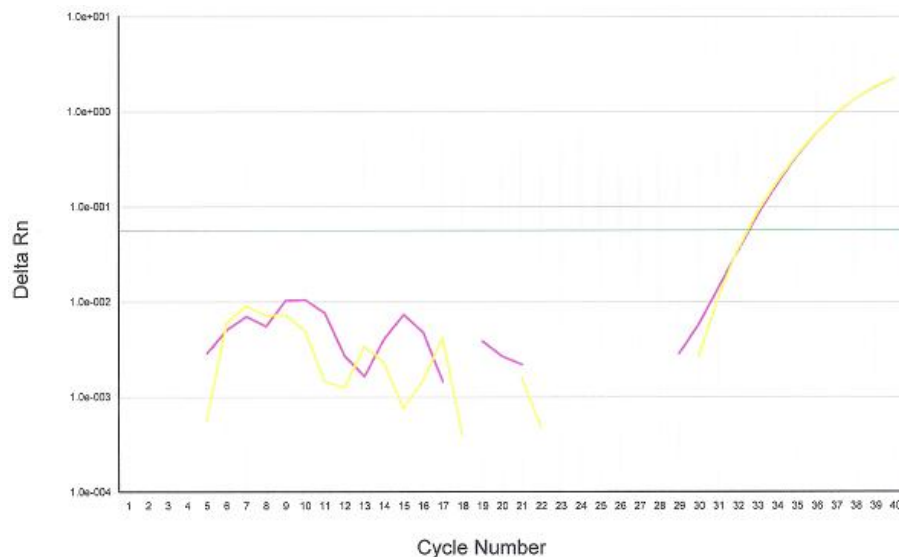
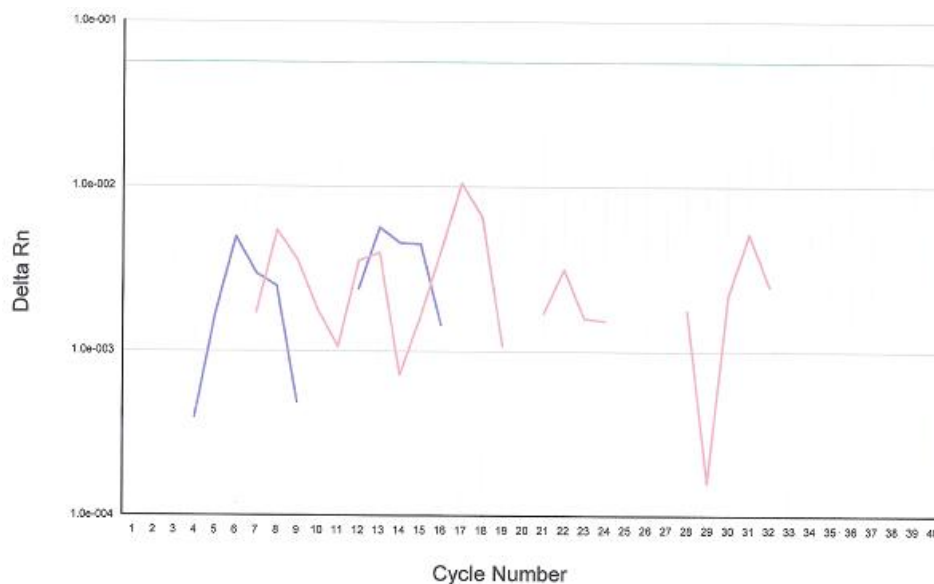


Fig. 23 Curva de amplificação de duas réplicas de uma amostra negativa ao HVF-1 (Original)



3.3.2.1 Esfregaços orofaríngeos

A carga viral oscilou entre valores de 0 e 17500 moléculas/ng no total da amostra (gráfico 17), com 10 (55,6%) amostras positivas e 8 (44,4%) negativas no grupo com sinais oculares (gráfico 18). Nos esfregaços dos indivíduos sem sinais, houve 2 (50%) resultados positivos e 2 (50%) negativos (gráfico 19). Foi calculada a média e o desvio-padrão para os diferentes grupos, obtendo-se valores consideravelmente mais baixos para os animais sem sinais (tabela 6).

Gráfico 17 Carga viral detectada nos esfregaços orofaríngeos (amostra global)

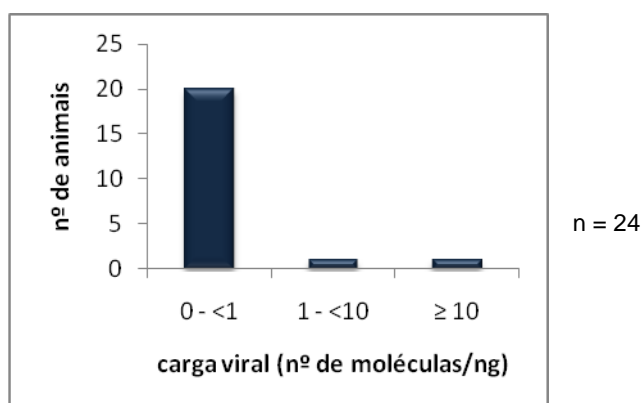


Gráfico 18 Carga viral detectada nos esfregaços orofaríngeos (indivíduos com sinais oculares)

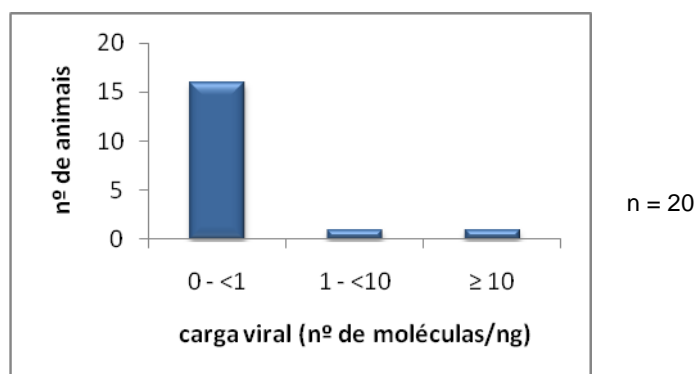


Gráfico 19 Carga viral detectada nos esfregaços orofaríngeos (animais sem sintomatologia ocular)

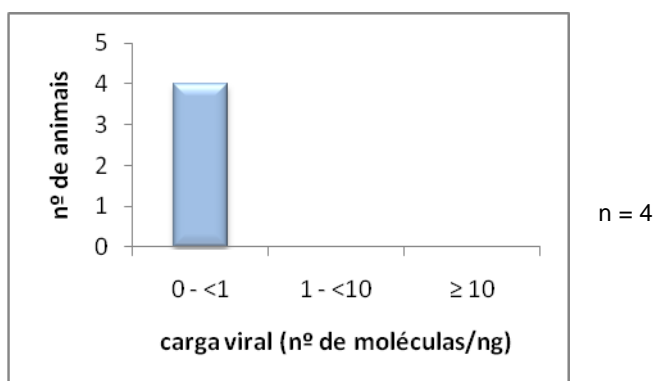


Tabela 8 Média e desvio-padrão da carga viral encontrada nos esfregaços orofaríngeos (moléculas/ng)

Grupo	Média	Desvio-padrão
Total da amostra	794,98	3727,04
Com sinais oculares	971,63	4120,39
Sem sinais oculares	0,06	0,07

3.3.2.2 Esfregaços conjuntivais do olho direito

O valor mínimo de carga viral foi igual (0 moléculas/ng), mas o valor máximo foi bastante mais baixo do que nos esfregaços orofaríngeos (4,01 moléculas/ng) (gráfico 20).

Nos indivíduos com sinais oculares, registaram-se 15 (75%) positivos e 5 (25%) negativos (gráfico 21), enquanto nos animais sem sintomatologia ocular houve 1 (25%) positivo e 3 (75%) negativos (gráfico 22). A média e o desvio-padrão foram mais baixos neste último grupo (tabela 7).

Gráfico 20 Carga viral detectada nos esfregaços conjuntivais do olho direito (amostra global)

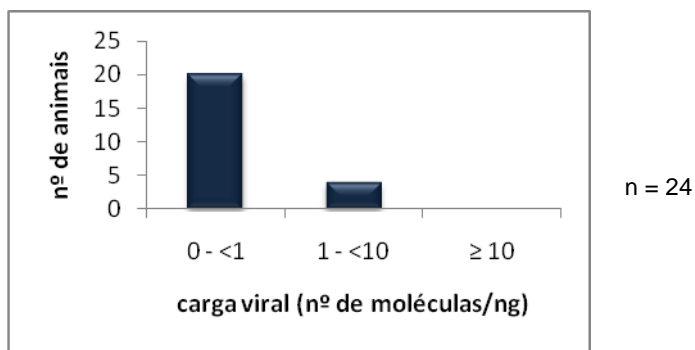


Gráfico 21 Carga viral detectada nos esfregaços conjuntivais do olho direito (indivíduos com sinais oculares)

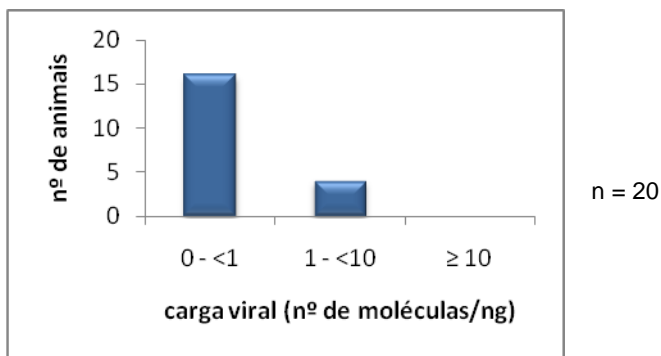


Gráfico 22 Carga viral detectada nos esfregaços conjuntivais do olho direito (animais sem sintomatologia ocular)

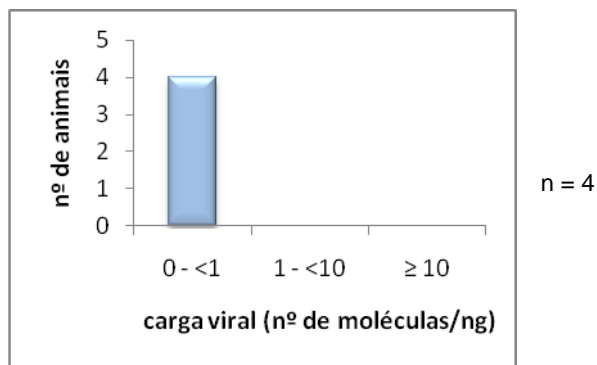


Tabela 9 Média e desvio-padrão da carga viral encontrada nos esfregaços conjuntivais do olho direito (moléculas/ng)

Grupo	Média	Desvio-padrão
Total da amostra	0,5	1
Com sinais oculares	0,57	1,08
Sem sinais oculares	0,16	0,31

3.3.2.3 Esfregaços conjuntivais do olho esquerdo

A quantidade de HIV-1 variou entre 0 e 986111,1 moléculas/ng (gráfico 23), com 11 (61,1%) dos esfregaços positivos e 7 (38,9%) negativos no grupo com sinais (gráfico 24). Os esfregaços dos indivíduos sem sinais contabilizaram 2 (66,7%) resultados positivos e 1 (33,3%) negativo (gráfico 25). Tal como nos esfregaços orofaríngeos e conjuntivais do olho direito, a média e o desvio-padrão do grupo sem sintomatologia ocular destacaram-se pelos seus reduzidos valores (tabela 8).

Gráfico 23 Carga viral detectada nos esfregaços conjuntivais do olho esquerdo (amostra global)

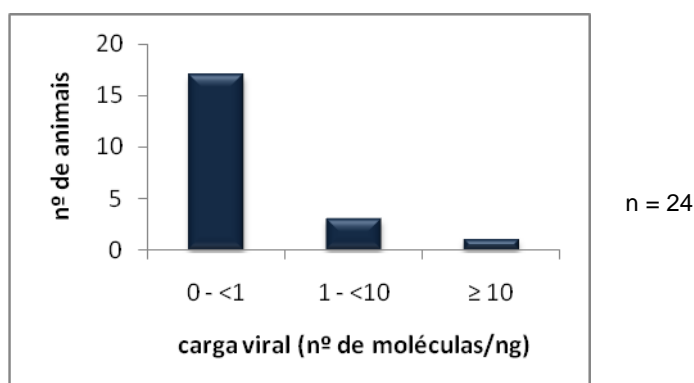


Gráfico 24 Carga viral detectada nos esfregaços conjuntivais do olho esquerdo (indivíduos com sinais oculares)

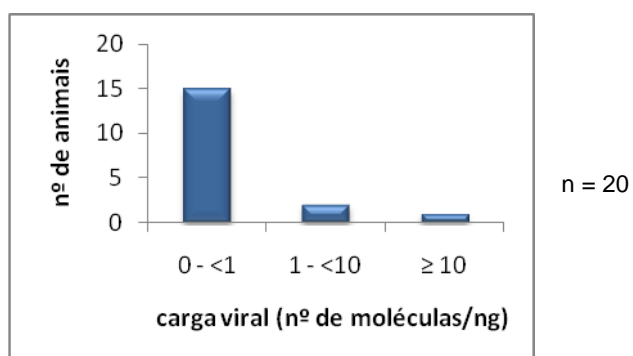


Gráfico 25 Carga viral detectada nos esfregaços conjuntivais do olho esquerdo (animais sem sintomatologia ocular)

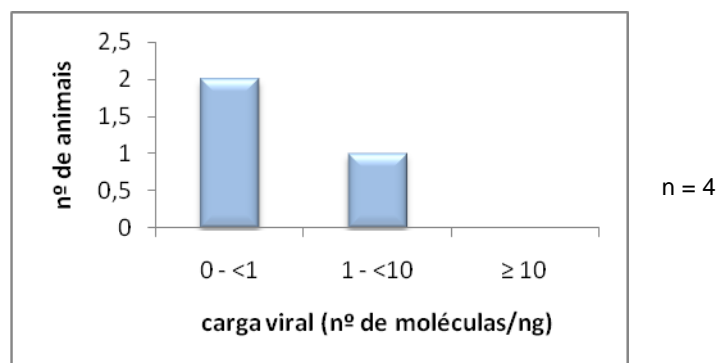


Tabela 10 Média e desvio-padrão da carga viral encontrada nos esfregaços conjuntivais do olho esquerdo (moléculas/ng)

Grupo	Média	Desvio-padrão
Total da amostra	46958,37	215186,9
Com sinais oculares	54784,64	232428,4
Sem sinais oculares	0,73	1,18

3.3.2.4 Prevalência global

Dos 24 animais testados, apenas 3 se mostraram negativos ao HVF-1 em todos os esfregaços analisados, o que significa que a prevalência global de infecção foi de 87,5%. Considerando os dois grupos em separado, a prevalência foi de 90% nos indivíduos com sinais oculares e de 75% nos indivíduos sem sinais.

3.3.2.5 Comparação com o PCR convencional

Os dois tipos de PCR mostraram-se concordantes em 76,5% das amostras testadas. Todas as amostras positivas por PCR convencional se revelaram igualmente positivas por PCR *real-time*. Quatro resultados que foram negativos com a modalidade convencional mostraram-se, no entanto, positivos com o *real-time*.

3.3.2.5.1 Esfregaços orofaríngeos

Dos 3 esfregaços negativos a HVF-1 por PCR convencional, 2 mostraram-se positivos com o PCR *real-time*.

3.3.2.5.2 Esfregaços conjuntivais do olho direito

Também neste caso, 3 amostras foram negativas a HVF-1 por PCR convencional, mas apenas uma se revelou positiva com a técnica *real-time*.

3.3.2.5.3 Esfregaços conjuntivais do olho esquerdo

Somente 2 esfregaços tiveram resultado negativo, tendo um deles passado a positivo com o PCR *real-time*.

3.4 Resultados do PCR para a *C. felis*

O PCR *real-time* para detecção de *C. felis* foi também aplicado a todas as amostras, mas apenas 1 animal, pertencente ao grupo dos gatos com sinais oculares, se mostrou positivo. A prevalência de infecção foi assim de 4,17% no total dos animais testados, de 5% no grupo com sinais oculares e de 0% no grupo sem sinais. Esta escassez de resultados positivos impossibilitou a pesquisa de correlações entre a sintomatologia e a carga de infecção da *C. felis*.

O indivíduo no qual se detectou esta bactéria apresentava glaucoma crónico no olho direito, e somente o esfregaço conjuntival correspondente a este olho revelou positividade, tendo sido detectada uma carga de infecção de 8,51 moléculas/ng. O esfregaço orofaríngeo e o esfregaço conjuntival do olho esquerdo tiveram ambos resultados negativos. Quanto ao PCR para HVF-1, revelou a presença de 0,07 moléculas/ng no olho direito e 0,66 moléculas/ng na orofaringe, tendo o olho esquerdo apresentado um resultado negativo.

Após se tomar conhecimento do resultado positivo para *C. felis*, instituiu-se antibioterapia sistémica com Ronaxan® (doxiciclina).

3.5 Correlações

Analisando os dois grupos que compunham a amostra em estudo, não foi possível, de acordo com o coeficiente de correlação de Spearman, encontrar uma relação entre a presença de sinais oculares e a carga viral presente nos esfregaços orofaríngeos ($p=0,604$), conjuntivais do olho direito ($p=0,172$) e conjuntivais do olho esquerdo ($p=0,881$).

Também não existe evidência de uma relação entre a presença de sinais relacionados com o tracto respiratório superior e a carga viral presente em cada tipo de esfregaço: $p=0,155$ para os esfregaços orofaríngeos, $p=0,054$ para os esfregaços conjuntivais do olho direito e $p=0,767$ para os do olho esquerdo.

Tentou-se ainda correlacionar a gravidade da sintomatologia com a carga viral, mas, da mesma forma, não havia uma associação significativa.

Em relação à *C. felis*, uma vez que só um animal se mostrou positivo, não foi possível encontrar quaisquer correlações.

Observaram-se, contudo, algumas correlações estatisticamente significativas entre outras variáveis (Anexo III).

3.5.1 Classe etária dos 2 aos 6 meses e carga viral nos esfregaços conjuntivais do olho esquerdo

Considerando apenas o grupo com sinais oculares, observou-se uma correlação negativa de 48,8% ($p=0,04$) entre estas duas variáveis. Na totalidade da amostra verificou-se uma correlação, também negativa, de 45,1% ($p=0,04$) (Anexo III).

3.5.2 Idade e simbléfaro

Colocando a idade sob a forma de uma variável quantitativa contínua, foi possível correlacioná-la com o simbléfaro de uma forma negativa nos indivíduos com sintomatologia ocular. O valor da correlação foi de 45,8% ($p=0,042$) (Anexo III).

3.5.3 Raça Persa e carga viral nos esfregaços conjuntivais do olho direito

Considerando a amostra como um todo, foi possível estabelecer uma correlação positiva de 42,8% ($p=0,037$) entre o facto de pertencer à raça Persa e a carga viral detectada nos esfregaços conjuntivais do olho direito. No entanto, se utilizássemos apenas os animais com sintomatologia ocular, tal correlação já não se verificava (Anexo III). Esta situação poderá justificar-se pela ausência de indivíduos da raça Persa no grupo de controlo negativo, no qual que as cargas de infecção são em média inferiores, pelo que a correlação observada no total da amostra não nos pareceu válida.

3.5.4 Conjuntivite e carga viral nos esfregaços orofaríngeos

Estas duas variáveis apresentaram uma correlação negativa de 57,5% ($p=0,013$) nos indivíduos com sinais oculares e de 48,5% ($p=0,022$) na totalidade da amostra (Anexo III).

3.5.5 Corrimento ocular purulento ou mucopurulento e carga viral nos esfregaços orofaríngeos

A presença de corrimento ocular purulento ou mucopurulento mostrou igualmente uma correlação negativa com a carga viral da orofaringe. A correlação assumiu um valor de 53,9% ($p=0,021$) para os animais com sintomatologia ocular e de 46,8 % ($p=0,028$) para a amostra global (Anexo III).

4 Discussão

4.1 Sexo, idade e raça no grupo com sinais oculares

Não está descrita, na bibliografia consultada, qualquer predisposição de sexo para o desenvolvimento de sinais oculares de coriza. O mesmo se verificou neste estudo, tendo o número de machos sido exactamente igual ao número de fêmeas no grupo de animais com sintomatologia.

Quanto à *idade*, a média foi razoavelmente elevada (5,1 anos), e a classe etária com um maior número de ocorrências foi a de 1 a menos de 5 anos de idade. Tais achados reflectem o facto, já referido anteriormente, de este grupo ser maioritariamente constituído por indivíduos com sintomatologia crónica ou recorrente, associada aos animais adultos (Thiry et al., 2009).

A *raça* mais representada foi o Europeu Comum, o que reflecte a proporção encontrada na população felina de Portugal, em que esta é a raça mais prevalente. Não considerámos válida a correlação encontrada entre a raça Persa e a carga viral no olho direito, por somente se verificar quando incluíamos na análise o grupo sem sinais, em que não havia gatos Persas. Não podemos, contudo, deixar de referir que 30% dos animais com sinais oculares pertenciam a raças braquicéfalas (Persa e Exótico), o que nos parece uma percentagem um pouco elevada. Estas raças apresentam uma sensibilidade corneana reduzida (Blocker & van der Woerd, 2001 citado por Crispin, 2008b), que pode tornar os episódios de queratite ulcerativa mais difíceis de tratar (Crispin, 2008b). É então provável que desenvolvam com maior frequência quadros de queratite aquando da reactivação do HVF-1 latente. De facto, no nosso estudo, quatro (67%) dos seis gatos braquicéfalos apresentavam queratite, pelo que esta parece ser uma justificação adequada. Adicionalmente, estas raças, tal como se referiu na revisão bibliográfica (Gaskell et al.,

2006), apresentam predisposição para desenvolver complicações crónicas da infecção herpética.

4.2 Sinais clínicos

O sinal clínico encontrado em maior número de animais foi o corrimento ocular, seguido da queratite. A frequência do primeiro é expectável, uma vez que pode surgir associado à conjuntivite (Crispin, 2008a) ou à queratite (Crispin, 2008b). Trata-se de um dos primeiros sinais observados na fase aguda da síndrome coriza (Nelson & Couto, 2006), sendo ainda a manifestação mais comum da infecção herpética crónica (Crispin, 2008a).

A queratite pode desenvolver-se durante a infecção primária pelo HVF-1 (Thiry et al., 2009), e é um problema típico nos animais que sofrem recrudescência por reactivação viral (Andrew, 2001), razão pela qual é tão prevalente nesta amostra.

4.3 Detecção de HVF-1 e *C. felis* por PCR

4.3.1 Prevalências

4.3.1.1 HVF-1

No presente estudo, a prevalência de infecção por HVF-1, determinada por PCR *real-time*, mostrou-se bastante elevada, tanto na amostra global (87,5%) como no grupo com sinais oculares (90%) e no grupo sem sinais (75%). Low e colegas (2007), que também pesquisaram este agente por PCR *real-time* em esfregaços conjuntivais, apenas o detectaram em 9,2% do total da amostra (animais com e sem conjuntivite) e em 12,2% dos indivíduos com conjuntivite. Estes valores foram considerados baixos, referindo-se que em outros estudos, que recorrem a variados métodos de detecção, como diferentes tipos de PCR, isolamento viral e imunofluorescência, a prevalência oscilou entre 1 e 88,9% (Low et al., 2007), havendo portanto uma grande amplitude de resultados.

Apesar de termos detectado, em relação a outros autores, maiores prevalências, as cargas virais foram bastante reduzidas. É possível que em muitos casos, devido à preocupação em fazer uma colheita rápida para evitar o desconforto do animal, e também à falta de colaboração por parte deste, não se tenha obtido uma quantidade suficiente de células. Sendo o HVF-1 um agente intracelular obrigatório, haverá, teoricamente, maior probabilidade de o encontrar quanto maior for o número de células colhidas. O esfregaço com zaragatoa é, em princípio, um método que não nos permite retirar muitas células, em comparação com uma raspagem ou uma biopsia (Maggs, 2008). Um esfregaço com escova de citologia apresentaria, teoricamente, vantagens em relação à zaragatoa, mostrando-se contudo menos agressivo que uma raspagem ou uma biopsia. No entanto, ao fazer uma

comparação experimental entre estes dois instrumentos, não se observaram diferenças na taxa de detecção do HVF-1 (Westermeyer, Kado-Fong & Maggs, 2008).

A prevalência por PCR convencional, em que apenas se incluíram animais com sinais oculares, mostrou-se mais baixa (66,7%), embora consideravelmente superior à relatada por Low e colegas (2007) para os gatos com conjuntivite testados por PCR convencional (12,2%). Foi também bastante mais elevada do que a descrita por Duarte e colegas (2008) (38%).

4.3.1.2 *C. felis*

A prevalência global (4,17%) e nos indivíduos com sinais (5%) foi muito inferior à do HVF-1, situando-se, no entanto, dentro da amplitude de valores descrita na literatura. No trabalho de Sjødahl-Essén e colegas (2008), por exemplo, em que se incluíram animais com e sem sinais, a prevalência foi de 0%, enquanto Helps, Reeves, Egan, Howard e Harbour (2003), que testaram 583 amostras enviadas para um laboratório de diagnóstico, detectaram a presença de *C. felis* em 18% das amostras. A prevalência nos animais sem sintomatologia (0%) está de acordo com a literatura, segundo a qual a prevalência nos gatos assintomáticos é baixa (Sykes, 2004).

4.3.1.3 Interpretação

A baixa prevalência da *C. felis* (apenas 1 animal se mostrou positivo), conjugada com a elevada prevalência do HVF-1, leva-nos a concluir que este último foi provavelmente responsável pelo desenvolvimento dos sinais oculares na maioria dos animais do nosso estudo. É de notar, contudo, que a taxa de detecção deste vírus também se mostrou bastante elevada no grupo controlo (75%), embora a média das cargas virais tenha sido sempre inferior. Parece então que, mesmo nos animais sem manifestações clínicas, a excreção deste agente é comum, embora a dimensão do nosso grupo controlo (n=4) seja insuficiente para fazer qualquer tipo de generalização. Estes dados não são surpreendentes se considerarmos que, de acordo com a bibliografia disponível, a infecção pelo HVF-1 é muito comum na população felina (Stiles, 2003), e que cerca de 80% dos indivíduos se tornam portadores (Crispin, 2005), sofrendo reactivação viral de uma forma periódica, normalmente sem sintomatologia associada (Andrew, 2001; Gaskell et al., 2006).

4.3.2 Comparação entre os dois tipos de PCR

A concordância apresentada entre o PCR convencional e o PCR *real-time* (76,5%) foi inferior àquela que Low e colegas (2007) encontraram (92,5%).

Dentro das quatro amostras que se revelaram negativas no primeiro mas positivas no segundo, duas tinham uma carga viral bastante reduzida (0,01 moléculas/ng). Nestas, a baixa quantidade de DNA viral leva a uma maior probabilidade de este não se encontrar

distribuído homogeneamente por toda a amostra. Assim, a quantidade de DNA poderá ter sido menor na porção retirada para o PCR convencional do que na porção retirada para o *real-time*, levando a que o resultado fosse negativo num e positivo no outro. Alternativamente, a discordância pode ser atribuída a uma maior sensibilidade do PCR *real-time*.

Nas outras duas amostras, em que a carga viral era mais elevada (0,11 e 0,96 moléculas/ng), a diferença entre os resultados ocorreu provavelmente devido a uma maior sensibilidade da técnica *real-time*.

Estes resultados parecem indicar que, no nosso estudo, o PCR *real-time* mostrou maior sensibilidade do que a modalidade convencional, o que está de acordo com aquilo que se encontra descrito na literatura (Gunson et al., 2006).

4.4 Correlações

Um dos objectivos deste estudo era verificar se existe uma correlação entre a carga de infecção do HVF-1 e da *C. felis* e os sinais clínicos observados. Como já se referiu, não foi possível pesquisar a existência desta correlação para a *C. felis*. Quanto ao HVF-1, embora a média das cargas virais tenha sido sempre superior no grupo com sinais, não foi possível encontrar uma relação estatisticamente significativa entre a presença de sinais oculares compatíveis com um diagnóstico de coriza e a quantidade de herpesvírus detectada nos diferentes esfregaços. O mesmo se verificou em relação aos sinais respiratórios superiores. Também não houve uma relação significativa entre a gravidade da sintomatologia e a carga viral. Low e colegas (2007) depararam-se com uma situação semelhante, não tendo encontrado diferenças significativas entre as médias das cargas virais dos gatos saudáveis, gatos com história de conjuntivite e gatos com conjuntivite activa que participaram no seu estudo.

No nosso trabalho, a quantificação das cargas virais feita pelo PCR *real-time* não pareceu oferecer, assim, qualquer vantagem do ponto de vista clínico. O *real-time* mostrou-se, contudo, aparentemente mais sensível do que a técnica clássica, embora apenas tenham sido comparadas 17 amostras, uma quantidade insuficiente para se poder tirar conclusões.

O sequestro da córnea e a queratite eosinofílica são duas entidades clínicas cuja relação com o HVF-1 não se encontra comprovada. No nosso estudo, não se encontrou qualquer correlação entre estas alterações e a carga viral detectada por PCR *real-time*. Tal facto pode ter-se devido, pelo menos em parte, à reduzida dimensão da amostra e ao baixo número de casos de sequestro (apenas 3) e principalmente de queratite eosinofílica (que somente afectava 1 animal).

4.4.1 Classe etária dos 2 aos 6 meses e carga viral nos esfregaços conjuntivais do olho esquerdo

A classe etária dos 2 aos 6 meses diferiu significativamente das restantes, no sentido de apresentar uma maior probabilidade de detecção de cargas virais mais baixas no olho esquerdo. Esta constatação parece contradizer a literatura disponível, segundo a qual a infecção primária ocorre normalmente nos gatinhos, causando doença aguda, na qual se libertam grandes quantidades de vírus facilmente detectáveis por PCR. A susceptibilidade à infecção é particularmente elevada no período em que se dá o declínio dos anticorpos de origem materna, ou seja, a partir das 9 semanas. A doença crónica ou recorrente, em que se libertam quantidades diminutas do agente, é, pelo contrário, característica dos gatos adultos (Gaskell et al., 2006; Maggs, 2005; Stiles, 2003). Neste estudo, os 3 animais pertencentes à classe etária dos 2 aos 6 meses tiveram de facto resultados negativos para o HVF-1 no olho esquerdo, apesar de todos mostrarem sintomatologia nesse olho. Tal fenómeno pode indicar que, apesar de o HVF-1 ter constituído a causa inicial dos sinais, foi eventualmente eliminado pela resposta imunológica, a qual se tornou exagerada, acabando por perpetuar a inflamação e a sintomatologia ocular na ausência do vírus (Maggs, 2005). Esta teoria encontra-se mais desenvolvida a propósito da correlação negativa entre a conjuntivite e a carga viral na orofaringe. Em alternativa, os sinais oculares podem ter-se devido a outro agente (estes três animais foram negativos para *C. felis*, pelo que o *M. felis* seria a opção mais plausível).

4.4.2 Idade e simbléfaro

A correlação negativa entre estas duas variáveis, que significa que o simbléfaro mostrou uma associação com idades mais jovens, está de acordo com aquilo que se encontra descrito na literatura. Tal como refere Stiles (2003), esta alteração, em que ocorre adesão da conjuntiva a si própria ou à córnea, surge normalmente nos gatinhos. Na nossa amostra, de facto, a idade média dos animais com simbléfaro era bastante baixa (os quatro indivíduos afectados tinham, respectivamente, 2 meses, 5 meses, 1 ano e 4 anos).

4.4.3 Conjuntivite e carga viral nos esfregaços orofaríngeos

A correlação negativa observada entre a presença de conjuntivite e a carga viral na orofaringe parece inesperada, uma vez que, sendo o HVF-1 responsável pelo desenvolvimento de conjuntivite, maiores quantidades do agente deveriam estar ligadas a uma maior probabilidade de encontrar esta lesão. A explicação de Maggs (2005) sobre as duas formas como este vírus causa doença podem, contudo, esclarecer-nos melhor e fornecer uma justificação adequada. Segundo este autor, o HVF-1 pode levar a alterações nos tecidos pelo seu efeito citolítico, que resulta de uma replicação viral activa, ou por mecanismos imunomediados. No segundo caso, as lesões devem-se essencialmente a uma

resposta imunitária exagerada, que apenas se desenvolve em alguns animais, sendo a replicação viral reduzida ou inexistente. A identificação do HVF-1 é, assim, mais difícil.

Se analisarmos os 7 gatos que apresentaram, na amostra em estudo, conjuntivite, verificamos que em 2 deles ela constituía um problema crónico que se prolongava há meses, não resultando, aparentemente, de reactivação viral mas sim de uma reacção inflamatória contínua, auto-perpetuante. O HVF-1, provável causa primitiva dos sinais oculares, teria nestes casos já pouca importância. Dos outros 5 animais, a conjuntivite, embora não tivesse uma duração tão prolongada, podia classificar-se como crónica em quatro, o que significa, por um lado, que a carga viral seria sempre mais baixa do que numa conjuntivite aguda e, por outro, que eram possíveis candidatos ao desenvolvimento das alterações imunomediadas descritas no parágrafo anterior. Apenas 1 indivíduo tinha sinais agudos, os quais derivavam, contudo, de uma reactivação viral que tinha vindo a ocorrer periodicamente a partir do momento em que, ainda como gatinho, tinha sofrido infecção primária.

Outra possível justificação seria a presença de um agente patogénico diferente que estivesse a causar conjuntivite. Contudo, a causa mais importante de conjuntivite felina é, para além do HVF-1, a *C. felis* (Johnson, 1984 citado por Helps et al., 2003), que não foi detectada em nenhum dos gatos com conjuntivite. Quanto ao CVF, não é considerado importante no desenvolvimento de sinais oculares (Ramsey, 2000). O facto de estas conjuntivites terem sido causadas pelo *M. felis* é, contudo, uma possibilidade que não se pode descartar.

4.4.4 Corrimento ocular purulento ou mucopurulento e carga viral nos esfregaços orofaríngeos

A infecção bacteriana secundária é comum no curso da infecção pelo HVF-1 e leva a que o corrimento ocular e o corrimento nasal se tornem purulentos (Thiry et al., 2009). Os animais que apresentam corrimento ocular purulento ou mucopurulento já estão assim numa fase mais avançada da doença, em que as bactérias oportunistas predominam e a quantidade de vírus se encontra em declínio, razão pela qual foi detectada uma correlação negativa entre este sinal clínico e a carga viral orofaríngea.

5 - Conclusão

Este trabalho permitiu traçar as características gerais de um grupo de animais com sintomatologia ocular, maioritariamente crónica ou recorrente, de coriza, bem como comparar a detecção de 2 agentes infecciosos (HVF-1 e *C. felis*) entre estes animais e um grupo controlo. Ao realizar a análise estatística dos resultados, deparámo-nos com algumas correlações que eram expectáveis. A correlação negativa que se encontrou entre os animais com 2 a 6 meses e a carga viral na conjuntiva do olho esquerdo, e entre a presença de conjuntivite e a carga viral orofaríngea, foi, no entanto, inesperada, e para a compreender na totalidade seria necessário realizar estudos adicionais.

A prevalência do HVF-1 mostrou-se elevada, mesmo nos indivíduos sem sinais. Segundo o teste da correlação de Spearman, a quantidade de vírus não mostrou uma relação significativa nem com a presença de sintomatologia ocular, nem com a gravidade dessa sintomatologia. Estes resultados devem, contudo, ser interpretados com cuidado, uma vez que a amostra utilizada tinha uma dimensão reduzida (n=24).

A utilização do PCR para HVF-1 como método complementar de diagnóstico parece assim constituir uma forma de confirmar o envolvimento deste vírus (do qual já se suspeita à partida). Mesmo com resultados negativos, sabemos que ele pode ter sido a causa inicial do problema, que foi depois perpetuado pelo próprio organismo. A sua detecção poderá talvez mostrar-se útil, contudo, para indicar quais os indivíduos em que terapêuticas como os anti-virais tópicos, o IFN e a lisina se encontram mais indicadas. A técnica *real-time* apresenta, em teoria, uma maior sensibilidade (Gunson et al., 2006), o que pareceu confirmar-se nas amostras que testámos. A quantificação das cargas virais, embora não se correlacione com a gravidade dos sinais, revela-nos quais os animais em que existe maior replicação do vírus, e portanto em que terapêuticas direccionadas contra este terão uma maior eficácia. Considerando que, na situação em estudo, os custos dos dois tipos de PCR são equivalentes, não parece haver desvantagens em utilizar o *real-time*.

A pesquisa da *C. felis* por PCR permite fazer uma escolha terapêutica mais apropriada para esta bactéria no caso de ela ser detectada. Não podemos também esquecer que este microorganismo pode ser zoonótico em indivíduos imunodeprimidos (Sykes, 2004), situação para a qual se devem alertar os proprietários.

Capítulo III – Referências bibliográficas

- Addie, D. & Ramsey, I. (2001). The laboratory diagnosis of infectious diseases. In I.K. Ramsey & B.J. Tennant, *Manual of canine and feline infectious diseases*. (pp 1-17). Gloucester: BSAVA.
- Addie, D.D., Radford, A., Yam, P.S. & Taylor, D.J. (2003). Cessation of feline calicivirus shedding coincident with resolution of chronic gingivostomatitis in a cat. *Journal of Small Animal Practice*, 44 (4), 172-176.
- Andrew, S.E. (2001). Ocular manifestations of feline herpesvirus. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 3 (1), 9-16.
- Azuma, Y., Hideki, H., Yamashita, A., Cai, Y., Rahman, M.A., Suzuki, H., Mitaku, S., Toh, H., Goto, S., Murakami, T., Sugi, K., Hayashi, H., Fukushi, H., Hattori, M., Kuhara, S. & Shirai, M. (2006). Genome sequence of the cat pathogen, *Chlamydophila felis*. *DNA research*, 13 (1), 15-23.
- Baldwin, S.L., Powell, T.D., Sellins, K.S., Radecki, S.V., Cohen, J.J. & Milhausen, M.J. (2004). The biological effects of five feline IFN- α subtypes. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 99 (3-4), 153-167.
- Bannasch, M.J. & Foley, J.E. (2005). Epidemiologic evaluation of multiple respiratory pathogens in cats in animal shelters. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 7 (2), 109-119.
- Barr, J.N. & Fearn, R. (2010). How RNA viruses maintain their genome integrity. *Journal of General Virology*, 91 (6), 1373-1387.
- Barrs, V.R., Allan, G.S., Martin, P., Beatty, J.A. & Malik, R. (2005). Feline pyothorax: a retrospective study of 27 cases in Australia. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 7 (4), 211-222.
- Beaumont, S.L., Maggs, D.J. & Clarke, H.E. (2003). Effects of bovine lactoferrin on in vitro replication of feline herpesvirus [abstract]. *Veterinary Ophthalmology*, 6 (3), 245-250.
- Binns, S.H., Dawson, S., Speakman, A.J., Cuevas, L.E., Gaskell, C.J., Hart, C.A., Morgan, K.L. & Gaskell, R.M. (1999). Prevalence and risk factors for feline *Bordetella bronchiseptica* infection. *The Veterinary Record*, 144 (21), 575-580.
- Bracklein, T., Theise, S., Metzler, A., Spiess, B.M. & Richter, M. (2006). Activity of feline interferon-omega after ocular or oral administration in cats as indicated by Mx protein expression in conjunctival and white blood cells. *American Journal of Veterinary Research*, 67 (6), 1025-1032.
- British Small Animal Veterinary Association (2000). Feline upper respiratory tract disease. *Journal of Small Animal Practice*, 41 (5), 230-232.
- Burgesser, K.M., Hotelling, S., Schiebel, A., Ashbaugh, S.E., Roberts, S.M. & Collins, J.K. (1999). Comparison of PCR, virus isolation, and indirect fluorescent antibody staining in the detection of naturally occurring feline herpesvirus infections. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 11 (2), 122-126.
- Cai, Y., Fukushi, H., Koyasu, S., Kuroda, E., Yamaguchi, T. & Hirai, K. (2002). An etiological investigation of domestic cats with conjunctivitis and upper respiratory tract disease in Japan. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 64 (3), 215-219.
- Chang, J. & Carter, R. (2010). Uveíte felina: uma revisão das suas causas, diagnóstico e tratamento. *Veterinary Medicine (edição portuguesa)*, 12 (69), 24-38.

- Coen, D.M. & Richman, D.D. (2007). Antiviral agents. In D.M. Knipe & P.M. Howley (Eds.), *Fields virology – volume one*. (5^a ed.). (pp 447-485). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Comissão especializada para a saúde animal (2006). *Simposium Veterinário*. [CD-ROM]. Apifarma.
- Coyne, K.P., Dawson, S., Radford, A.D., Cripps, P.J., Porter, C.J., McCracken, C.M. & Gaskell, R.M. (2006). Long-term analysis of feline calicivirus prevalence and viral shedding patterns in naturally infected colonies of domestic cats. *Veterinary Microbiology*, 118 (1-2), 12-25.
- Coyne, K.P., Gaskell, R.M., Dawson, S., Porter, C.J. & Radford, A.D. (2007). Evolutionary mechanisms of persistence and diversification of a calicivirus within endemically infected natural host populations. *Journal of Virology*, 81 (4), 1961-1971.
- Coyne, K.P., Jones, B.R., Kipar, A., Chantrey, J., Porter, C.J., Barber, P.J., Dawson, S., Gaskell, R.M. & Radford, A.D. (2006). Lethal outbreak of disease associated with feline calicivirus infection in cats. *Veterinary Record*, 158 (16), 544-550.
- Crispin, S. (2008a). The conjunctiva. In S. Peterson-Jones & S. Crispin (Eds.), *Manual of small animal ophthalmology*. (pp 124-133). Gloucester: BSAVA.
- Crispin, S. (2008b). The cornea. In S. Peterson-Jones & S. Crispin (Eds.), *Manual of small animal ophthalmology*. (pp 134-154). Gloucester: BSAVA.
- Crispin, S. (2008c). The lacrimal system. In S. Peterson-Jones & S. Crispin (Eds.), *Manual of small animal ophthalmology*. (pp 105-123). Gloucester: BSAVA.
- Cripin, S.M. (2005). *Notes on veterinary ophthalmology*. Oxford: Blackwell.
- Cullen, C.L., Wadowska, D.W., Singh, A. & Melekhovets, Y. (2005). Ultrastructural findings in feline corneal sequestra. *Veterinary Ophthalmology*, 8 (5), 295-303.
- Cunningham, J.G. (2004). *Tratado de fisiologia veterinária*. (3^a ed.). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Davison, A.J., Eberle, R., Ehlers, B., Hayward, G.S., McGeoch, D.J., Minson, A.C., Pellett, P.E., Roizman, B., Studdert, M.J. & Thiry, E. (2009). The order Herpesvirales. *Archives of Virology*, 154 (1), 171-177.
- Dawson, S., Jones, D., McCracken, C.M., Gaskell, R.M., Hart, C.A. & Gaskell, C.J. (2000). *Bordetella bronchiseptica* infection in cats following contact with infected dogs. *The Veterinary Record*, 146 (2), 46-48.
- De Man, M.M.G. & Ducatelle, R.V. (2007). Bilateral subcutaneous fibrosarcomas in a cat following feline parvo-, herpes- and calicivirus vaccination. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 9 (5), 432-434.
- Dean, R., Harley, R., Helps, C., Caney, S. & Gruffydd-Jones, T. (2005). Use of quantitative real-time PCR to monitor the response of *Chlamydomphila felis* infection to doxycycline treatment. *Journal of Clinical Microbiology*, 43 (4), 1858-1864.
- Dharmaraj, S. (2010). *RT-PCR: the basics*. Acedido em Nov. 6, 2010, em <http://www.ambion.com/techlib/basics/rtpcr/index.html>.

- Di Martino, B., Di Rocco, C., Ceci, C. & Marsilio, F. (2009). Characterization of a strain of feline calicivirus isolated from a dog faecal sample. *Veterinary Microbiology*, 139 (1-2), 52-57.
- Diesem, C. (1986a). Generalidades sobre órgãos sensoriais e integumento comum: o órgão da visão. In S. Sisson, J.D. Grossman & R. Getty (Eds.), *Anatomia dos animais domésticos: volume 1*. (pp 207-222). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Diesem, C. (1986b). Órgãos dos sentidos do carnívoro e tegumento comum: órgão da visão. In S. Sisson, J.D. Grossman & R. Getty (Eds.), *Anatomia dos animais domésticos: volume 2*. (pp 1635-1660). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Dinnage, J.D., Scarlett, J.M. & Richards, J.R. (2009). Descriptive epidemiology of feline upper respiratory tract disease in an animal shelter. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 11 (10), 816-825.
- Drazenovich, T.L., Fascetti, A.J., Westermeyer, H.D., Sykes, J.E., Bannasch, M.J., Kass, P.H., Hurley, K.F. & Maggs, D.J. (2009). Effects of dietary lysine supplementation on upper respiratory and ocular disease and detection of infectious organisms in cats within an animal shelter. *American Journal of Veterinary Research*, 70 (11), 1391-1400.
- Driciru, M., Siefert, L., Prager, K.C., Dubovi, E., Sande, R., Princee, F., Friday, T. & Munson, L. (2006). A serosurvey of viral infections in lions (*Panthera leo*), from Queen Elizabeth National Park, Uganda. *Journal of Wildlife Diseases*, 42 (3), 667-671.
- Duarte, A., Alberto, A., Delgado, E., Sales-Luís, J. & Tavares, L. (2008). Avaliação de um ensaio de PCR para diagnóstico de herpesvírus felino em animais com lesões oftalmológicas. *Proceedings do IV Congresso de Ciências Veterinárias, INRB/INIA Fonte Boa, Portugal, 27-29 Novembro 2008, p. 201*.
- Duarte, A., Delgado, E., Sales-Luís, J. & Tavares, L. (2005). Detecção de herpesvírus felino em animais com lesões oftalmológicas. *Proceedings do Congresso de Ciências Veterinárias 2005, EZN, Fonte Boa, 13-15 Outubro 2005*.
- Egberink, H., Addie, D., Belák, S., Boucraut-Baralon, C., Frymus, T., Gruffydd-Jones, T., Hartmann, K., Hosie, M.J., Lloret, A., Lutz, H., Marsilio, F., Pennisi, M.G., Radford, A.D., Thiry, E., Truyen, U. & Horzinek, M.C. (2009). *Bordetella bronchiseptica* infection in cats – ABCD guidelines on prevention and management. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 11 (7), 610-614.
- Fascetti, A.J., Maggs, D.J., Kanchuk, M.L., Clarke, H.E. & Rogers, Q.R. (2004). Excess dietary lysine does not cause lysine-arginine antagonism in adult cats [expanded abstract]. *The Journal of Nutrition*, 134 (8), 2042-2045.
- Filoni, C., Catão-Dias, J.L., Bay, G., Durigon, E.L., Pinto Jorge, R., Lutz, H. & Hofmann-Lehmann, R. (2006). First evidence of feline herpesvirus, calicivirus, parvovirus, and *Ehrlichia* exposure in brazilian free-ranging felids. *Journal of Wildlife Diseases*, 42 (2), 470-477.
- Foley, J.E. (2006). Calicivirus: spectrum of disease. In J.R. August (Ed.), *Consultations in feline internal medicine: volume 5*. (pp 3-9). Missouri: Elsevier Saunders.
- Foley, J.E., Rand, C., Bannasch, M.J., Norris, C.R. & Milan, J. (2002). Molecular epidemiology of feline bordetellosis in two animal shelters in California, USA. *Preventive Veterinary Medicine*, 54 (2), 141-156.

- Fontenelle, J.P., Powell, C.C., Veir, J.K., Radecki, S.V. & Lappin, M.R. (2008). Effect of topical ophthalmic application of cidofovir on experimentally induced primary ocular feline herpesvirus-1 infection in cats. *American Journal of Veterinary Research*, 69 (2), 289-293.
- Foster, S.F., Barrs, V.R., Martin, P. & Malik, R. (1998). Pneumonia associated with *Mycoplasma* spp in three cats. *Australian Veterinary journal*, 76 (7), 460-464.
- Foster, S.F., Martin, P., Allan, G.S., Barrs, V.R. & Malik, R. (2004). Lower respiratory tract infections in cats: 21 cases (1995-2000). *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 6 (3), 167-180.
- Gaskell, R., Dawson, S., Radford, A. & Thiry, E. (2007). Feline herpesvirus. *Veterinary Research*, 38 (2), 337-354.
- Gaskell, R.M. & Bennett, M. (1999). Infectious diseases of the cat. In J. Dunn, *Textbook of small animal medicine*. (pp. 959-984). Kent: W. B. Saunders.
- Gaskell, R.M. & Dawson, S. (2005). Other feline virus diseases. In S.J. Ettinger & E.C. Feldman (Eds.), *Textbook of veterinary internal medicine: volume one*. (6^a ed.). (pp 667-671). Missouri: Elsevier Saunders.
- Gaskell, R.M., Dawson, S. & Radford, A. (2006). Feline respiratory disease. In C.E. Greene (Ed.), *Infectious diseases of the dog and cat*. (3^a ed.). (pp 145-154). Missouri: Saunders Elsevier.
- Gaskell, R.M., Radford, A.D. & Dawson, S. (2004). Feline infectious respiratory disease. In E.A. Chandler, C.J. Gaskell & R.M. Gaskell (Eds.), *Feline medicine and therapeutics*. (3^a ed.). (pp 577-595). Oxford: Blackwell Publishing.
- Gerhardt, N., Schulz, B.S., Werckenthin, C. & Hartmann, K. (2006). Pharmacokinetics of enrofloxacin and its efficacy in comparison with doxycycline in the treatment of *Chlamydophila felis* infection in cats with conjunctivitis. *The Veterinary Record*, 159 (18), 591-594.
- Gilbert, C., Bestman-Smith, J. & Boivin, G. (2002). Resistance of herpesviruses to antiviral drugs: clinical impacts and molecular mechanisms. *Drug Resistance Updates*, 5 (2), 88-114.
- Gould, D. (2008). Ophthalmic drugs. In S. Petersen-Jones & S. Crispin (Eds.), *Manual of small animal ophthalmology*. (pp 50-59). Gloucester: BSAVA.
- Gray, L.D., Ketring, K.L. & Tang, Y. (2005). Clinical use of 16S RNA gene sequencing to identify *Mycoplasma felis* and *M. gateae* associated with feline ulcerative keratitis. *Journal of Clinical Microbiology*, 43 (7), 3431-3434.
- Griffiths, A.J., Wessler, S.R., Lewontin, R.C., Gellbart, W.M., Suzuki, D.T. & Miller, J.H. (2005). *Introduction to genetic analysis*. (8^a ed.). New York: W.H. Freeman and company.
- Gruffydd-Jones, T., Addie, D., Belak, S., Boucraut-Baralon, C., Egberink, H., Frymus, T., Hartmann, K., Hosie, M.J., Lloret, A., Lutz, H., Marsilio, F., Pennisi, M.G., Radford, A.D., Thiry, E., Truyen, U. & Horzinek, M.C. (2009). *Chlamydophila felis* infection – ABCD guidelines on prevention and management. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 11 (7), 605-609.

- Gunson, R.N., Collins, T.C. & Carman, W.F. (2006). Practical experience of high throughput real time PCR in the routine diagnostic virology setting. *Journal of Clinical Virology*, 35 (4), 355-367.
- Haid, C., Kaps, S., Gonczi, E., Hassig, M., Metzler, A., Spiess, B. & Richter, M. (2007). Pretreatment with feline interferon omega and the course of subsequent infection with feline herpesvirus in cats. *Veterinary Ophthalmology*, 10 (5), 278-284.
- Hartley, C. (2010a). Aetiology of corneal ulcers – assume FHV-1 unless proven otherwise. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 12 (1), 24-35.
- Hartley, C. (2010b). Treatment of corneal ulcers – what are the medical options? *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 12 (5), 384-397.
- Hartley, J.C., Stevenson, S., Robinson, A.J., Littlewood, J.D., Carder, C., Cartledge, J., Clark, C. & Ridgway, G.L. (2001). Conjunctivitis due to *Chlamydophila felis* (*Chlamydia psittaci* feline pneumonitis agent) acquired from a cat: case report with molecular characterization of isolates from the patient and cat. *Journal of Infection*, 43 (1), 7-11.
- Hartmann, A.D., Helps, C.R., Lappin, M.R., Werckenthin, C. & Hartmann, K. (2008). Efficacy of pradofloxacin in cats with feline upper respiratory tract disease due to *Chlamydophila felis* or *Mycoplasma* infections. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 22 (1), 44-52.
- Helps, C., Reeves, N., Egan, K., Howard, P. & Harbour, D. (2003). Detection of *Chlamydophila felis* and Feline Herpesvirus by multiplex real-time PCR analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 41 (6), 2734-2736.
- Helps, C.R., Lait, P., Damhuis, A., Bjornehammar, U., Bolta, D., Brovida, C., Chabanne, L., Egberink, H., Ferrand, G., Fontbonne, A., Pennisi, M.G., Gruffydd-Jones, T., Gunn-Moore, D., Hartmann, K., Lutz, H., Malandain, E., Mostl, K., Stengel, C., Harbour, D.A. & Graat, E.A. (2005). Factors associated with upper respiratory tract disease caused by feline herpesvirus, feline calicivirus, *Chlamydophila felis* and *Bordetella bronchiseptica* in cats: experience from 218 European catteries. *The Veterinary Record*, 156 (21), 669-673.
- Holland, J.L., Outerbridge, C.A. & Affolter, V.K. (2006). Detection of feline herpesvirus 1 DNA in skin biopsy specimens from cats with or without dermatitis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 229 (9), 1442-1446.
- Hoskins, J.D. (1999). Feline respiratory diseases. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 29 (4), 945-958.
- Hurley, K.F. & Sykes, J.E. (2003). Update on feline calicivirus: new trends. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 33 (4), 759-772.
- Hussein, I.T., Menashy, R.V. & Field, H.J. (2008). Penciclovir is a potent inhibitor of feline herpesvirus-1 with susceptibility determined at the level of virus-encoded thymidine kinase. *Antiviral Research*, 78 (3), 268-274.
- Infarmed (2010a). *Clorocil colírio*. Acedido em Nov. 17, 2010 em http://www.infarmed.pt/infomed/detalhes.php?med_id=2014&dc_i=&nome_comer=Y2xvcm9jaWw=&dosagem=&forma_farmac=&atc=&estado_aim=&pesquisa_titular=&pagina=1.

- Infarmed (2010b). *Clorocil pomada oftálmica*. Acedido em Nov. 17, 2010 em http://www.infarmed.pt/infomed/detalhes.php?med_id=2015&dci=&nome_comer=Y2xvcm9jaWw=&dosagem=&forma_farmac=&atc=&estado_aim=&pesquisa_titular=&pagina=1.
- Infarmed (2010c). *Crotax*. Acedido em Nov. 17, 2010 em http://www.infarmed.pt/infomed/detalhes.php?med_id=45129&dci=dmFsYWNPY2xvdmly&nome_comer=&dosagem=&forma_farmac=&atc=&estado_aim=&pesquisa_titular=&pagina=1.
- Infarmed (2010d). *Fenivir*. Acedido em Nov. 17, 2010 em http://www.infarmed.pt/infomed/detalhes.php?med_id=9048&dci=cGVuY2ljbG92aXI=&nome_comer=&dosagem=&forma_farmac=&atc=&estado_aim=&pesquisa_titular=&pagina=1.
- Infarmed (2010e). *Penciclovir Novartis 250 mg pó para solução para perfusão*. Acedido em Nov. 17, 2010 em http://www.infarmed.pt/infomed/detalhes.php?med_id=9678&dci=cGVuY2ljbG92aXI=&nome_comer=&dosagem=&forma_farmac=&atc=&estado_aim=&pesquisa_titular=&pagina=1.
- Infarmed (2010f). *Terrcil*. Acedido em Nov. 17, 2010 em http://www.infarmed.pt/infomed/detalhes.php?med_id=8399&dci=&nome_comer=dGVycmljaWw=&dosagem=&forma_farmac=&atc=&estado_aim=&pesquisa_titular=&pagina=1.
- Infarmed (2010g). *Virgan gele oftálmico*. Acedido em Nov. 17, 2010 em http://www.infarmed.pt/infomed/detalhes.php?med_id=31213&dci=Z2FuY2ljbG92aXI=&nome_comer=&dosagem=&forma_farmac=&atc=&estado_aim=&pesquisa_titular=&pagina=1.
- Infarmed (2010h). *Zovirax*. Acedido em Nov. 17, 2010 em http://www.infarmed.pt/infomed/detalhes.php?med_id=9510&dci=&nome_comer=em92aXJheA==&dosagem=&forma_farmac=&atc=&estado_aim=&pesquisa_titular=&pagina=1.
- Johnson, L.R., Drazenovich, N.L. & Foley, J.E. (2004). A comparison of routine culture with polymerase chain reaction technology for the detection of *Mycoplasma* species in feline nasal samples. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 16 (4), 347-351.
- Johnson, L.R., Foley, J.E., De Cock, H.E., Clarke, H.E. & Maggs, D.J. (2005). Assessment of infectious organisms associated with chronic rhinosinusitis in cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 227 (4), 579-585.
- Junqueira, L.C. & Carneiro, J. (2004). *Histologia básica*. (10ª ed.). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Lappin, M.R., Andrews, J., Simpson, D. & Jensen, W.A. (2002). Use of serologic tests to predict resistance to feline herpesvirus 1, feline calicivirus, and feline parvovirus infection in cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 220 (1), 38-42.
- Lappin, M.R., Veir, J.K., Satyaraj, E. & Czarnecki-Maulden, G. (2009). Pilot study to evaluate the effect of oral supplementation of *Enterococcus faecium* SF68 on cats with latent feline herpesvirus 1. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 11 (8), 650-654.

- Lee, M., Bosward, K.L. & Norris, J.M. (2010). Immunohistological evaluation of feline herpesvirus-1 in feline eosinophilic dermatoses or stomatitis. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 12 (2), 72-79.
- Liehmman, L., Degasper, B., Spargser, J. & Niebauer, G.W. (2006). *Mycoplasma felis* arthritis in two cats. *Journal of Small Animal Practice*, 47 (8), 476-479.
- Low, H.C., Powell, C.C., Veir, J.K., Hawley, J.R. & Lappin, M.R. (2007). Prevalence of feline herpesvirus 1, *Chlamydomydia felis*, and *Mycoplasma* spp DNA in conjunctival cells collected from cats with and without conjunctivitis. *American Journal of Veterinary Research*, 68 (6), 643-648.
- Maggs, D.J. & Clarke, H.E. (2004). In vitro efficacy of ganciclovir, cidofovir, penciclovir, foscarnet, idoxuridine, and acyclovir against feline herpesvirustype-1. *American Journal of Veterinary Research*, 65 (4), 399-403.
- Maggs, D.J. (2005). Update on pathogenesis, diagnosis, and treatment of feline herpesvirus type 1. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*, 20 (2), 94-101.
- Maggs, D.J. (2008). Laboratory investigation of ophthalmic disease. In S. Petersen-Jones & S. Crispin (Eds.), *Manual of small animal ophthalmology*. (pp. 23-29). Gloucester: BSAVA.
- Maggs, D.J., Collins, B.K., Thorne, J.G. & Nasisse, M.P. (2000). Effects of L-lysine and L-arginine on in vitro replication of feline herpesvirus type-1. *American Journal of Veterinary Research*, 61 (12), 1474-1478.
- Maggs, D.J., Lappin, M.R. & Nasisse, M.P. (1999a). Detection of feline herpesvirus-specific antibodies and DNA in aqueous humor from cats with or without uveitis. *American Journal of Veterinary Research*, 60 (8), 932-936.
- Maggs, D.J., Lappin, M.R., Reif, J.S., Collins, J.K., Carman, J., Dawson, D.A. & Bruns, C. (1999b). Evaluation of serologic and viral detection methods for diagnosing feline herpesvirus-1 infection in cats with acute respiratory tract or chronic ocular disease. *Journal of the American Veterinary Medical association*, 214 (4), 502-507.
- Maggs, D.J., Sykes, J.E., Clarke, H.E., Yoo, S.H., Kass, P.H., Lappin, M.R., Rogers, Q.R., Waldron, M.K. & Fascetti, A.J. (2007). Effects of dietary lysine supplementation in cats with enzootic upper respiratory disease. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 9 (2), 97-108.
- Malik, R., Lessels, N.S., Webb, S., Meek, M., Graham, P.G., Vitale, C., Norris, J.M. & Power, H. (2009). Treatment of feline herpesvirus-1 associated disease in cats with famciclovir and related drugs. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 11 (1), 40-48.
- Martella, V., Pratelli, A., Gentile, M., Buonavoglia, D., Decaro, N., Fiorente, P. & Buonavoglia, C. (2002). Analysis of the capsid protein gene of a feline-like calicivirus isolated from a dog. *Veterinary Microbiology*, 85 (4), 315-322.
- Masubuchi, K., Nosaka, H., Iwamoto, K., Kokubu, T., Yamanaka, M. & Shimizu, Y. (2002). Experimental infection of cats with *Chlamydomydia felis*. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 64 (12), 1165-1168.
- Moore, P.A. (2005). Feline corneal disease. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*, 20 (2), 83-93.

- Mould, J.R.B. (2008). Ophthalmic examination. In S. Petersen-Jones & S. Crispin (Eds.), *Manual of small animal ophthalmology*. (pp 1-12). Gloucester: BSAVA.
- Mouzin, D.E., Lorenzen, M.J., Haworth, J.D. & King, V.L. (2004). Duration of serologic response to three viral antigens in cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 224(1), 61-66.
- Munson, L., Marker, L., Dubovi, E., Spencer, J.A., Evermann, J.F. & O'Brien, S.J. (2004). Serosurvey of viral infections in free-ranging Namibian cheetahs (*Acinonyx jubatus*). *Journal of Wildlife Diseases*, 40 (1), 23-31.
- Murphy, F.A., Gibbs, E.P., Horzinek, M.C. & Studdert, M.J. (1999). *Veterinary virology*. (3^a ed.). California: Academic press.
- Nasisse, M.P. (2000). Ocular feline herpesvirus-1 infection. In J.D. Bonagura (Ed.), *Kirk's current veterinary therapy XIII – small animal practice*. (13^a ed.). (pp 1057-1060). Philadelphia: Saunders.
- Nasisse, M.P., Glover, T.L., Moore, C.P. & Weigler, B.J. (1998). Detection of feline herpesvirus DNA in corneas of cats with eosinophilic keratitis or corneal sequestration. *American Journal of Veterinary Research*, 59 (7), 856-858.
- Nelson, D.L. & Cox, M.M. (2005). *Lehninger principles of biochemistry*. (4^a ed.). New York: Freeman.
- Nelson, R.W. & Couto, C.G. (2006). *Medicina interna de pequenos animais*. (3^a ed.). Rio de Janeiro: Elsevier.
- Nolte, F.S. & Caliendo, A.M. (2007). Molecular detection and identification of microorganisms. In P.R. Murray, E.J. Baron, J.H. Jorgensen, M.L. Landry & M.A. Pfaller (Eds.), *Manual of clinical microbiology, volume 1*. (9^a ed.). (pp 218-244). Washington, D.C.: ASM Press.
- Ollivier, F.J., Gilger, B.C., Barrie, K.P., Kallberg, M.E., Plummer, C.E., O'Reilly, S., Gelatt, K.N. & Brooks, D.E. (2007). Proteinases of the cornea and preclear tear film. *Veterinary Ophthalmology*, 10 (4), 199-206.
- Owen, W.M., Sturgess, C.P., Harbour, D.A., Egan, K. & Gruffydd-Jones, T.J. (2003). Efficacy of azithromycin for the treatment of feline chlamydophilosis. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 5 (6), 305-311.
- Pedersen, N.C., Elliott, J.B., Glasgow, A., Poland, A. & Keel, K. (2000). An isolated epizootic of hemorrhagic-like fever in cats caused by a novel and highly virulent strain of feline calicivirus. *Veterinary Microbiology*, 73 (4), 281-300.
- Pesavento, P.A., Chang, K. & Parker, J.S. (2008). Molecular virology of feline calicivirus. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 38 (4), 775-786.
- Plumb, D.C. (2005). *Veterinary drug handbook*. (3^a ed.). Iowa: Blackwell.
- Prescott, L.M., Harley, J.P. & Klein, D.A. (2005). *Microbiology*. (6^a ed.). New York: McGraw-Hill.
- Quinn, P.J., Markey, B.K., Carter, M.E., Donnelly, W.J. & Leonard, F.C. (2002). *Veterinary microbiology and microbial disease*. Oxford: Blackwell Publishing.

- Radford, A.D., Addie, D., Belák, S., Boucraut-Baralon, C., Egberink, H., Frymus, T., Gruffydd-Jones, T., Hartmann, K., Hosie, M.J., Lloret, A., Lutz, H., Marsilio, F., Pennisi, M.G., Thiry, E., Truyen, U. & Horzinek, M.C. (2009). Feline calicivirus infection – ABCD guidelines on prevention and management. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 11 (7), 556-564.
- Radford, A.D., Coyne, K.P., Dawson, S., Porter, C.J. & Gaskell, R.M. (2007). Feline calicivirus. *Veterinary Research*, 38 (2), 319-335.
- Radford, A.D., Turner, P.C., Bennett, M., McArdle, F., Dawson, S., Glenn, M.A., Williams, R.A. & Gaskell, R.M. (1998). Quasispecies evolution of a hypervariable region of the feline calicivirus capsid gene in cell culture and in persistently infected cats. *Journal of General Virology*, 79 (1), 1-10.
- Ramsey, D.T. (2000). Feline *Chlamydia* and calicivirus infections. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 30 (5), 1015-1028.
- Ramsey, I.K. & Tennant, B.J. (2001). Manual of canine and feline infectious diseases. Gloucester: BSAVA.
- Rand, J. (2006). Problem-based feline medicine. Philadelphia: Saunders Elsevier.
- Rees, T.M & Lubinski, J.L. (2008). Oral supplementation with L-lysine did not prevent upper respiratory infection in a shelter population of cats. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 10 (5), 510-513.
- Reynolds, B.S., Poulet, H., Pingret, J., Jas, D., Brunet, S., Lemeter, C., Etievant, M. & Boucraut-Baralon, C. (2009). A nosocomial outbreak of feline calicivirus associated virulent systemic disease in France. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 11 (8), 633-644.
- Rice, C.C., Kruger, J.M., Venta, P.J., Vilnis, A., Maas, K.A., Dulin, J.A. & Maes, R.K. (2002). Genetic characterization of 2 novel feline caliciviruses isolated from cats with idiopathic lower urinary tract disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 16 (3), 293-302.
- Sandmeyer, L.S., Keller, C.B. & Bienzle, D. (2005). Effects of interferon- α on cytopathic changes and titers for feline herpesvirus-1 in primary cultures of feline corneal epithelial cells. *American Journal of Veterinary Research*, 66 (2), 210-216.
- Schorr-Evans, E.M., Poland, A., Johnson, W.E. & Pedersen, N.C. (2003). An epizootic of highly virulent feline calicivirus disease in a hospital setting in New England. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 5 (4), 217-226.
- Scott, F.W. & Geissinger, C.M. (1999). Long-term immunity in cats vaccinated with an inactivated trivalent vaccine. *American Journal of Veterinary Research*, 60 (5), 652-658.
- Siebeck, N., Hurley, D.J., Garcia, M., Greene, C.E., Kostlin, R.G., Moore, P.A. & Dietrich, U.M. (2006). Effects of human recombinant alpha-2b interferon and feline recombinant omega interferon on in vitro replication of feline herpesvirus-1. *American Journal of Veterinary Research*, 67 (8), 1406-1411.
- Sjodahl-Essén, T., Tidholm, A., Thorén, P., Persson-Wadman, A., Bolske, G., Aspán, A. & Berndtsson, L.T. (2008). Evaluation of different sampling methods and results of real-time PCR for detection of feline herpes virus-1, *Chlamydomydia felis* and *Mycoplasma felis* in cats. *Veterinary Ophthalmology*, 11(6), 375-380.

- Slatter, D. (2001). Fundamentals of veterinary ophthalmology. (3^a ed.). Philadelphia: Saunders.
- Sparkes, A.H., Caney, S.M., Sturgess, C.P. & Gruffydd-Jones, T.J. (1999). The clinical efficacy of topical and systemic therapy for the treatment of feline ocular chlamydiosis. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 1 (1), 31-35.
- Speakman, A.J., Dawson, S., Binns, S.H., Gaskell, C.J., Hart, C.A. & Gaskell, R.M. (1999). *Bordetella bronchiseptica* infection in the cat. *Journal of Small Animal Practice*, 40 (6), 252-256.
- Spiess, A.K., Sapienza, J.S. & Mayordomo, A. (2009). Treatment of proliferative feline eosinophilic keratitis with topical 1,5% cyclosporine: 35 cases. *Veterinary Ophthalmology*, 12 (2), 132-137.
- Spindel, M.E., Veir, J.K., Radecki, S.V. & Lappin, M.R. (2008). Evaluation of pradofloxacin for the treatment of feline rhinitis. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 10 (5), 472-479.
- Stiles, J. & Pogradichniy, R. (2008). Detection of virulent feline herpesvirus-1 in the corneas of clinically normal cats. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 10 (2), 154-159.
- Stiles, J. (2003). Feline herpesvirus. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*, 18 (3), 178-185.
- Stiles, J. (2006). Ocular infections. In C.E. Greene (Ed.), *Infectious diseases of the dog and cat*. (3^a ed.). (pp 974-991). Missouri: Saunders Elsevier.
- Stiles, J., Townsend, W.M., Rogers, Q.R. & Krohne, S.G. (2002). Effect of oral administration of L-lysine on conjunctivitis caused by feline herpesvirus in cats. *American Journal of Veterinary Research*, 63 (1), 99-103.
- Storch, G.A. (2007). Diagnostic virology. In D.M. Knipe & P.M. Howley (Eds.), *Fields virology – volume one*. (5^a ed.). (pp 565-604). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Sturgess, C.P., Gruffydd-Jones, T.J., Harbour, D.A. & Jones, R.L. (2001). Controlled study of the efficacy of clavulanic acid-potentiated amoxycillin in the treatment of *Chlamydia psittaci* in cats. *The Veterinary Record*, 149 (3), 73-76.
- Sykes, J.E. (2004). Chlamydial infections. In E.A. Chandler, C.J. Gaskell & R.M. Gaskell (Eds.), *Feline medicine and therapeutics*. (3^a ed.). (pp 651-658). Oxford: Blackwell Publishing.
- Sykes, J.E., Allen, J.L., Studdert, V.P. & Browning, G.F. (2001). Detection of feline calicivirus, feline herpesvirus 1 and *Chlamydia psittaci* mucosal swabs by multiplex RT-PCR/PCR. *Veterinary microbiology*, 81 (2), 95-108.
- Sykes, J.E., Anderson, G.A., Studdert, V.P. & Browning, G.F. (1999). Prevalence of feline *Chlamydia psittaci* and feline herpesvirus 1 in cats with upper respiratory tract disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 13 (3), 153-162.
- Taira, O., Suzuki, M., Takeuchi, Y., Aramaki, Y., Sakurai, I., Watanabe, T., Motokawa, K., Arai, S., Sato, H. & Maehara, N. (2005). Expression of feline interferon- α subtypes in *Escherichia coli*, and their antiviral activity and animal species specificity. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 67 (5), 543-545.

- TerWee, J., Sabara, M., Kokjohn, K., Sandbulte, J., Frenchick, P. & Dreier, K.J. (1998). Characterization of the systemic disease and ocular signs induced by experimental infection with *Chlamydia psittaci* in cats. *Veterinary Microbiology*, 59 (4), 259-281.
- Thiry, E., Addie, D., Belák, S., Boucraut-Baralon, C., Egberink, H., Frymus, T., Gruffydd-Jones, T., Hartmann, K., Hosie, M.J., Lloret, A., Lutz, H., Marsilio, F., Pennisi, M.G., Radford, A.D., Truyen, U. & Horzinek, M.C. (2009). Feline herpesvirus infection – ABCD guidelines on prevention and management. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 11 (7), 547-555.
- Tilley, L.P. & Smith, F.W. (2000). The 5-minute Veterinary consult: canine and feline: version 2. [CD-ROM]. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins.
- Townsend, W.M., Stiles, J., Guptill-Yoran, L. & Krohne, S.G. (2004). Development of a reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay to detect feline herpesvirus-1 latency-associated transcripts in the trigeminal ganglia and corneas of cats that did not have clinical signs of ocular disease. *American Journal of Veterinary Research*, 65 (3), 314-319.
- Trow, A.V., Rozanski, E.A. & Tidwell, A.S. (2008). Primary mycoplasma pneumonia associated with reversible respiratory failure in a cat. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 10 (4), 398-402.
- Veir, J.K., Ruch-Gallie, R., Spindel, M.E. & Lappin, M.R. (2008). Prevalence of selected infectious organisms and comparison of two anatomic sampling sites in shelter cats with upper respiratory tract disease. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 10 (6), 551-557.
- Volovich, S., Benetka, V., Schwendenwein, I., Mostl, K., Sommerfeld-Stur, I. & Nell, B. (2005). Cytologic findings, and feline herpesvirus DNA and *Chlamydomphila felis* antigen detection rates in normal cats and cats with conjunctival and corneal lesions. *Veterinary Ophthalmology*, 8 (1), 25-32.
- Walker, R.L. (2003). Mollicutes. In D.C. Hirsh & Y.C. Zee, *Microbiologia Veterinária*. (pp. 155-162). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Westermeyer, H.D., Kado-Fong, H. & Maggs, D.J. (2008). Effects of sampling instrument and processing technique on DNA yield and detection rate for feline herpesvirus-1 via polymerase chain reaction assay. *American Journal of Veterinary Research*, 69 (6), 811-817.
- Whitley, R.D. (2000). Canine and feline primary ocular bacterial infections. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 30 (5), 1151-1167.
- Williams, D.L. & Robinson, J.C. (2005). Efficacy of topical acyclovir for the treatment of feline herpetic keratitis: results of a prospective clinical trial and data from in vitro investigations. *The Veterinary Record*, 157 (9), 254-257.
- Willoughby, K. & Bennett, M. (2004). Other infections. In E.A. Chandler, C.J. Gaskell & R.M. Gaskell, *Feline medicine and therapeutics*. (pp. 679-696). Oxford: Blackwell Publishing.
- Young, B. & Heath, J.W. (2001). *Wheater/Histologia functional*. (4^a ed.). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

Capítulo IV - Anexos

ANEXO I – ESTÁGIO CURRICULAR

O estágio curricular foi realizado em dois locais distintos: a Clínica Veterinária Dover, em Bogotá (Colômbia) e o Hospital Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária (HEFMV), em Lisboa, tendo decorrido em ambas as instituições na área de Clínica e Cirurgia de Animais de Companhia.

Estágio na Clínica Veterinária Dover

Constituiu a primeira parte do estágio curricular, compreendendo o período de 12 de Outubro de 2009 a 17 de Janeiro de 2010, com uma carga horária diária de 10 horas, num total de 60 horas semanais, perfazendo assim, no final deste período, cerca de 684 horas. As actividades desenvolvidas repartiram-se entre as áreas da Medicina Interna, Internamento e Cirurgia. As duas semanas finais foram dedicadas à prática de Laboratório Clínico.

No âmbito da Medicina Interna, foi permitida a assistência às consultas e auxílio ao Médico Veterinário assistente na realização do exame físico e de exames imagiológicos (radiografia, ecografia e ecocardiografia), anotação da história clínica, preparação de medicações e colheita de amostras. Quanto à casuística observada, excluindo as consultas de vacinação e primovacinação, observaram-se com maior regularidade casos de gastroenterites (fig. 1), neoplasias, problemas dermatológicos, alterações neurológicas e hipotireoidismo. A clínica era um centro de referência na área da Neurologia, disponibilizando consultas da especialidade. Alguns casos mais interessantes e esporádicos foram a febre do Shar Pei, a alopecia dos mutantes da cor e a presença de hidrocefalia num Chihuahua. Entre os animais atendidos, verificou-se um predomínio dos canídeos, pertencendo os restantes indivíduos à espécie felina. Apenas se observou uma consulta na área dos novos animais de companhia.

Fig. 1 Fluidoterapia em cachorro com gastroenterite



Dentro do Internamento, os estagiários eram responsáveis pela administração de medicações, alimentação e cuidados de higiene e bem-estar dos animais, realização do exame físico, monitorização de pacientes em estado crítico, colocação de cateteres endovenosos e eventual colheita de material biológico.

Na área da Cirurgia, a estagiária ajudava na preparação pré-cirúrgica dos pacientes, e desempenhou também as funções de circulante e ajudante de cirurgião dentro do Bloco Operatório, fazendo igualmente o acompanhamento pós-cirúrgico. As cirurgias mais frequentes, para além da castração e ovariectomia electivas, eram as intervenções ortopédicas, a exérese de neoplasias, a laparotomia exploratória e as destartarizações. Decorriam ainda com alguma frequência resoluções de entrópion. Alguns procedimentos mais invulgares incluíram a resolução de uma estenose da artéria pulmonar (fig. 2) e a correcção de um *shunt* portossistémico.

Fig. 2 Recuperação pós-cirúrgica após correcção de estenose da pulmonar



Na área laboratorial, aprendeu a realizar hemogramas, análises bioquímicas e urianálise tipo II, e ainda a elaborar e observar com microscópio óptico citologias, exames coprológicos e raspagens cutâneas.

Era ainda obrigatória, no âmbito deste estágio, a assistência semanal a exposições orais realizadas por outros estagiários e por Médicos Veterinários. A estagiária elaborou, igualmente, uma apresentação, com o tema “Coriza felina”.

Estágio no HEFMV

Teve lugar de 1 de Março a 1 de Junho de 2010, e dividiu-se entre as áreas de Medicina Interna, Oftalmologia, Imagiologia, Cirurgia e Internamento. A carga horária diária era de 8 horas, totalizando 40 horas semanais. Adicionalmente, a estagiária realizou cerca de dois turnos de 12 horas e dois turnos de 24 horas por mês, no âmbito do Internamento, perfazendo, ao fim de 3 meses, aproximadamente 540 horas.

Na Medicina Interna, era feita a colheita da história pregressa e o exame físico dos animais, juntamente com o auxílio ao Médico Veterinário assistente na realização de exames complementares de diagnóstico, preparação e administração de medicações e colheita de amostras. Para além das consultas de vacinação e primovacinação, os casos de gastroenterite, neoplasias, insuficiência renal crónica (muitas vezes causada, nos cães, por Leishmaniose) e doença do tracto urinário distal felino foram os mais comuns. Alguns casos particularmente interessantes foram uma meningoencefalite granulomatosa, um tromboembolismo aórtico em gato com consequente paraplégia, e uma polirradiculoneuropatia. Para além das consultas de canídeos e felídeos, foi ainda possível

assistir a algumas consultas de referência de novos animais de companhia, como pequenos mamíferos, aves e répteis.

Quanto à Oftalmologia, foi permitida a colaboração nas consultas desta área, realizando o exame oftalmológico e colhendo a história pregressa, e o auxílio nas cirurgias da especialidade. A conjuntivite e queratite, tanto em cães como em gatos, apresentaram-se com bastante frequência, sendo na espécie felina causadas, muitas vezes, pelos agentes de coriza, o que possibilitou uma boa casuística para a componente prática da Dissertação de Mestrado (fig. 3). Eram ainda comuns as cataratas, a distiquíasis, o Pannus e o glaucoma. Particularmente invulgar foi a observação de *Arcus lipoides cornea* e de *Collie eye anomaly*. Outras alterações interessantes observadas nas consultas foram a atrofia progressiva da retina e a perfuração traumática da córnea com prolapso da íris.

Fig. 3 Gato com queratite herpética recorrente



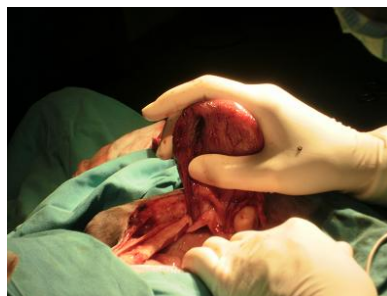
No âmbito da Imagiologia, a estagiária assistiu e colaborou em exames radiográficos (radiologia digital) e ultrassonográficos (ecografia abdominal e ecocardiografia), assim como em algumas TACs.

Na Cirurgia (fig. 5), auxiliava na preparação dos pacientes e desempenhou funções de anestesista, ajudante de cirurgião e circulante. Acompanhava ainda os animais no período pós-cirúrgico. As intervenções mais frequentes, para além da castração e ovariectomia electivas, foram a mastectomia, a destartarização e extracção dentária e a exérese de neoplasias. Dentro da cirurgia oftalmológica, observaram-se vários procedimentos, como a enucleação (fig. 4), a remoção de massas palpebrais e a resolução de prolapso da íris.

Fig. 4 Enucleação



Figura 5 Laparotomia exploratória



Dentro do Internamento, era responsável pela preparação e administração das medicações, colocação de cateteres endovenosos, monitorização clínica (incluindo frequência cardíaca e respiratória, temperatura, glicemia e pressão arterial), acompanhamento pós-cirúrgico, vigilância de pacientes em estado crítico, cuidados de higiene e bem-estar e alimentação dos animais.

ANEXO II – QUADRO COM OS RESULTADOS TOTAIS DA AMOSTRA

Com sinais oculares	Identificação dos animais				Sintomatologia ocular						Sinais do tracto respiratório superior	Gravidade da sintomstologis			PCR convencional para HVF-1	PCR <i>real time</i> para HVF-1 (carga viral em moléculas/ng)			PCR <i>real time</i> para <i>C. felis</i>
	Nome	Sexo	Idade	Raça	Uni ou bilateral	Queratite	Conjuntivite	Corrimento ocular	Glaucoma	Simbléfaro		Geral	OD	OE		Orofaringe	OD	OE	
	Leia	F	12	EC	Unilateral	Ausente	Presente	Presente, mucoso	Ausente	Ausente	Ausentes	Ligeira	Ligeira	Ausente	Negativo	0	0	0	Negativo
	Cookie	M	1	Exótico	Unilateral	Presente, com sequestro	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausentes	Ligeira	Ausente	Moderada	Positivo	0,06	0,11	0,11	Negativo
	Brownie	M	5	Exótico	Bilateral	Presente, ulcerativa	Ausente	Presente	Ausente	Ausente	Ausentes	Moderada	Moderada	Moderada	Positivo	0,97	0,7	4,54	Negativo
	Lucky	M	4	EC	Unilateral	Presente, ulcerativa	Presente	Presente	Ausente	Ausente	Ausentes	Moderada	Grave	-----	Positivo	0,04	0,04	-----	Negativo
	Pégaso	M	14	Persa	Bilateral	Ausente	Presente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausentes	Ligeira	Ligeira	Ligeira	Positivo	0,01	2,52	0,07	Negativo
	Teresinha	F	8	EC	Bilateral	Presente, com sequestro	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausentes	Ligeira	Moderada	Moderada	Negativo	0,96	0	0,01	Negativo
	Nucha	F	4	Persa	Unilateral	Presente, com sequestro	Ausente	Presente, purulento	Ausente	Ausente	Ausentes	Moderada	Ausente	Grave	-----	0	0,03	9861 11,1	Negativo
	Simba	M	0,42	EC	Bilateral	Presente	Presente	Ausente	Ausente	Presente	Ausentes	Grave	Grave	Moderada	-----	0	0,02	0	Negativo
	Julieta	F	10	EC	Bilateral	Ausente	Ausente	Presente, acastanhado	Ausente	Ausente	Ausentes	Ligeira	Ligeira	Ligeira	-----	-----	0,13	0,07	Negativo
	Crazy eyes	M	0,17	EC	Bilateral	Presente, ulcerativa	Presente	Presente, purulento	Ausente	Presente	Presentes	Grave	Grave	Grave	-----	0	0,05	0	Negativo
	Schnappy	M	3	EC	Bilateral	Ausente	Ausente	Presente, acastanhado	Ausente	Ausente	Ausentes	Ligeira	Ligeira	Ligeira	-----	17500	0	0	Negativo
	Fofinha	F	4	EC	Unilateral	Ausente	Ausente	Presente, seroso	Ausente	Ausente	Ausentes	Ligeira	Ausente	Ligeira	-----	0,4	0	0,55	Negativo
	Heidi	F	1	EC	Unilateral	Ausente	Ausente	Ausente	Presente	Ausente	Ausentes	Ligeira	Ligeira	Ausente	-----	0,65	0,07	0	Positivo
	Alice	F	3	EC	Unilateral	Ausente	Presente	Presente, seroso	Ausente	Ausente	Ausentes	Ligeira	Ligeira	Ligeira	-----	0	1,03	0,22	Negativo
	Joaninha	F	0,17	EC	Unilateral	Presente	Ausente	Presente, purulento	Ausente	Ausente	Ausentes	Ligeira	Ausente	Moderada	-----	0	0,028	0	Negativo

	Maggie	F	1	EC	Bilateral	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Presente	Ausentes	Ligeira	Ligeira	Ligeira	-----	3,92	0,1	0,37	Negativo
	Figaro	M	13	Persa	Bilateral	Ausente	Ausente	Presente, acastanhado	Ausente	Ausente	Ausentes	Ligeira	Ligeira	Ligeira	-----	0,56	0,55	0,26	Negativo
	Kiko	M	4	EC	Unilateral	Presente, ulcerativa	Presente	Ausente	Ausente	Presente	Presentes	Grave	Grave	Ausente	-----	0	2,1	6,16	Negativo
	Mickey	M	2	EC x Siamês	Bilateral	Presente	Ausente	Presente, mucopurulento	Ausente	Ausente	Ausentes	Moderada	Moderada	Moderada	-----	0	0	0	Negativo
	Kathy	F	13	Persa	Unilateral	Presente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Presentes	Moderada	Ligeira	Ausente	-----	-----	4,01	-----	Negativo
Sem sinais oculares	Bicho	M	0,92	EC	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	0,06	0,63	-----	Negativo
	Diego	M	3	EC	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	0,16	0	0,09	Negativo
	Anúbis	M	2	EC	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	0	0	0	Negativo
	Ísis	F	2	EC	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	0	0	2,09	Negativo

ANEXO III – TABELAS DA CORRELAÇÃO DE SPEARMAN

Tabela 1 – Correlação de Spearman entre a classe etária dos 2 aos 6 meses e a carga viral nos esfregaços conjuntivais do olho esquerdo (grupo com sinais oculares)

Correlations			de2a6meses	CargaOE
Spearman's rho	de2a6meses	Correlation Coefficient	1,000	-,488*
		Sig. (2-tailed)	.	,040
		N	18	18
	CargaOE	Correlation Coefficient	-,488*	1,000
		Sig. (2-tailed)	,040	.
		N	18	18

*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

Tabela 2 - Correlação de Spearman entre a classe etária dos 2 aos 6 meses e a carga viral nos esfregaços conjuntivais do olho esquerdo (amostra total)

Correlations			de2a6meses	CargaOE
Spearman's rho	de2a6meses	Correlation Coefficient	1,000	-,451*
		Sig. (2-tailed)	.	,040
		N	21	21
	CargaOE	Correlation Coefficient	-,451*	1,000
		Sig. (2-tailed)	,040	.
		N	21	21

*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

Tabela 3 – Correlação de Spearman entre a idade e a presença de simbléfaro (grupo com sinais oculares)

Correlations			Simbléfaro	Idade
Spearman's rho	Simbléfaro	Correlation Coefficient	1,000	-,458 [*]
		Sig. (2-tailed)	.	,042
		N	20	20
	Idade	Correlation Coefficient	-,458 [*]	1,000
		Sig. (2-tailed)	,042	.
		N	20	20

*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

Tabela 4 – Correlação de Spearman entre a raça Persa e a carga viral nos esfregaços conjuntivais do olho direito (amostra total)

Correlations			Persa	CargaOD
Spearman's rho	Persa	Correlation Coefficient	1,000	,428 [*]
		Sig. (2-tailed)	.	,037
		N	24	24
	CargaOD	Correlation Coefficient	,428 [*]	1,000
		Sig. (2-tailed)	,037	.
		N	24	24

*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

Tabela 5 – Correlação de Spearman entre a raça Persa e a carga viral nos esfregaços conjuntivais do olho direito (grupo com sinais oculares)

Correlations			Persa	CargaOD
Spearman's rho	Persa	Correlation Coefficient	1,000	,437
		Sig. (2-tailed)	.	,054
		N	20	20
	CargaOD	Correlation Coefficient	,437	1,000
		Sig. (2-tailed)	,054	.
		N	20	20

Tabela 6 – Correlação de Spearman entre a presença de conjuntivite e a carga viral nos esfregaços orofaríngeos (grupo com sinais oculares)

Correlations			Conjuntivite	CargaBoca
Spearman's rho	Conjuntivite	Correlation Coefficient	1,000	-,575*
		Sig. (2-tailed)	.	,013
		N	18	18
	CargaBoca	Correlation Coefficient	-,575*	1,000
		Sig. (2-tailed)	,013	.
		N	18	18

*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

Tabela 7 – Correlação de Spearman entre a presença de conjuntivite e a carga viral nos esfregaços orofaríngeos (amostra total)

Correlations			Conjuntivite	CargaBoca
Spearman's rho	Conjuntivite	Correlation Coefficient	1,000	-,485 [*]
		Sig. (2-tailed)	.	,022
		N	22	22
	CargaBoca	Correlation Coefficient	-,485 [*]	1,000
		Sig. (2-tailed)	,022	.
		N	22	22

*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

Tabela 8 – Correlação de Spearman entre a presença de corrimento ocular purulento ou mucopurulento e a carga viral nos esfregaços orofaríngeos (grupo com sinais oculares)

Correlations			Corrimentopurulento/mucopurulento	CargaBoca
Spearman's rho	Corrimentopurulento/mucopurulento	Correlation Coefficient	1,000	-,539 [*]
		Sig. (2-tailed)	.	,021
		N	18	18
	CargaBoca	Correlation Coefficient	-,539 [*]	1,000
		Sig. (2-tailed)	,021	.
		N	18	18

*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

Tabela 9 – Correlação de Spearman entre a presença de corrimento ocular purulento ou mucopurulento e a carga viral nos esfregaços orofaríngeos (amostra total)

Correlations				
			Corrimentopurulento/mucopurulento	CargaBoca
Spearman's rho	Corrimentopurulento/mucopurulento	Correlation Coefficient	1,000	-,468 [*]
		Sig. (2-tailed)	.	,028
		N	22	22
	CargaBoca	Correlation Coefficient	-,468 [*]	1,000
		Sig. (2-tailed)	,028	.
		N	22	22

*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).